

**Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf
Prozesse der epithelial-mesenchymalen Transition in Lungen- und
Pankreaskarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Vangerow, Aliena Stephanie
aus Kelheim

Gießen 2026

Medizinische Klinik und Poliklinik IV-Innere Medizin

Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität

Gutachterin: Prof. Dr. Klaudia Giehl

Gutachterin: Prof. Dr. Anne Schänzer

Tag der Disputation: 23.03.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.2	Epidemiologie und Therapie des Lungenkarzinoms	1
1.3	Das Protoonkogen K-Ras4B	2
1.4	Die K-Ras-Mutation G12C	3
1.4.1	Häufigkeiten von K-Ras-Mutationen in Pankreas- und Lungenkarzinomen	3
1.4.2	Inhibition von G12C-mutiertem K-Ras	4
1.5	Beschreibung einiger Ras-abhängiger intrazellulärer Signalwege	6
1.6	Aufbau des zellulären Zytoskeletts	9
1.6.1	Aufbau von Intermediärfilamenten	9
1.6.2	Das Intermediärfilament Vimentin	10
1.6.3	Das Intermediärfilament Keratin	10
1.6.4	Das Aktinzytoskelett und Aktin-assoziierte Proteine	11
1.6.5	Aufbau interzellulärer Kontakte	11
1.7	Die epithelial-mesenchymale Transition	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Geräte	16
2.1.4	Software	17
2.1.5	Molekularbiologische Kits	17
2.1.6	qRT-PCR-Primer	18
2.1.7	Lösungen und Puffer	18
2.1.8	Marker für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.1.9	Wachstumsfaktoren	20
2.1.10	Inhibitoren und Verdünnungsmittel	20
2.1.11	Zelllinien	21
2.1.12	Primäre Antikörper für Immunoblotting und Immunfluoreszenz	21
2.1.13	Sekundäre Antikörper für Immunoblotting und Immunfluoreszenz	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Kultivieren der Zellen	23
2.2.2	Passagieren von Zellen	24
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	24
2.2.4	Herstellung von Proteinlysaten	24
2.2.5	Tritonfraktionierung	25
2.2.6	Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure	25
2.2.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.2.8	Immunoblotting	27
2.2.9	Immunfluoreszenzverfahren	29
2.2.10	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	30
2.2.11	Densitometrische Auswertung	31
2.2.12	Messung der Zellfläche	31
2.2.13	Quantifizierung Vinkulin- und Paxillin-haltiger Fokalkontakte	32
2.2.14	Statistische Formeln	32
2.2.15	Erstellen der Abbildungen	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf Signaltransduktionsmoleküle in HCC-44- und H23-Zellen	33
3.1.1	Nachweis der Aktivierbarkeit von ERK1/2 und Akt durch FCS in HCC-44- und H23-Zellen	33
3.1.2	Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf intrazelluläre Signalwege	34

3.2	Charakterisierung des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibition auf Proteine des Zytoskeletts	47
3.2.1	Bindung von MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C in MIA PaCa-2-Zellen	48
3.2.2	Veränderungen der Morphologie von H23-, HCC-44- und MIA PaCa-2-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition	49
3.2.3	Untersuchung der Wirkung der K-Ras G12C-Inhibition auf Vimentin und Zytoskelett-assoziierte Proteine im Immunoblotverfahren	53
3.2.4	Expression des Vimentin-Gens in MIA PaCa-2-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition	62
3.2.5	Analyse des Einflusses von MRTX849 und AMG510 auf Vimentin mittels Tritonfraktionierung	63
3.3	Analyse des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibition auf das Zytoskelett in MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen	66
3.4	Zunahme der Zellfläche und der Fokalkontakte durch K-Ras G12C-Inhibition in MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen	82
4	Diskussion	85
4.1	Verminderung der Aktivität Ras-abhängiger Signalmoleküle durch MRTX849 und AMG510	86
4.2	Nachweis der Bindung von MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C	88
4.3	Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren auf EMT-assoziierte Prozesse	89
4.3.1	Veränderung der Zellform durch die K-Ras G12C-Inhibitoren	90
4.3.2	Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren auf das mesenchymale Markerprotein Vimentin	91
4.3.3	Erhöhte Aktin-Stressfaserbildung durch MRTX849 und AMG510	95
4.3.4	β -Catenin- und Paxillin-Reorganisation in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen	96
4.4	Fazit und Ausblick	97
5	Zusammenfassung	100
6	Abstract	101
7	Abkürzungsverzeichnis	102
8	Literatur	104
9	Anhang	114
9.1	Ergänzende Tabellen	114
9.2	Ergänzende Abbildungen	123
9.3	Makro zur Quantifizierung Vinkulin- und Paxillin-haltiger Fokalkontakte	124
10	Ehrenwörtliche Erklärung	125
11	Danksagung	126

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Die meisten Pankreaskarzinome befinden sich im exokrinen Anteil des Pankreas und sind zu 80-90 % duktale Adenokarzinome (PDAC). Diese entwickeln sich aus nicht invasiven Neoplasien, die durch Mutationen in Onkogenen (z.B. *K-Ras*) und durch den Verlust von Tumorsuppressorgenen entstehen (137). Die häufigsten nicht invasiven Neoplasien sind pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), die sich über die Stadien 1A, 1B, 2 und 3 durch weitere Akkumulation von genetischen Veränderungen zum invasiven PDAC entwickeln (137). So wurde mit Fortschreiten der PanIN-Stadien eine steigende Konzentration von *K-Ras*-Mutationen nachgewiesen (56). In der Therapie des Pankreaskarzinoms kommt bisher der Chemotherapie eine zentrale Rolle zu, sowohl nach primär kurativer Resektion als auch zur Tumorreduktion bei lokal fortgeschrittenen Tumoren und in der Palliativsituation (116). Jedoch ist die Prognose des Pankreaskarzinoms mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 11 % sehr schlecht (103). Die schlechte Prognose der Pankreaskarzinome ergibt sich aus der Diagnostizierung in meist fortgeschrittenen Stadien aufgrund der häufig fehlenden oder unspezifischen Symptome (130).

1.2 Epidemiologie und Therapie des Lungenkarzinoms

Im Jahr 2020 waren Karzinome der Lunge die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen (103). Als größter Risikofaktor für die Entstehung eines Lungenkarzinoms gilt das Tabakrauchen (103). Bei Lungenkarzinomen von Rauchern oder ehemaligen Rauchern konnte eine höhere Mutationsrate von *K-Ras* im Vergleich zu Nicht-Rauchern nachgewiesen werden (25). Histologisch wird das Lungenkarzinom in *small cell lung cancer* (SCLC, ca. 15 %) und *non small cell lung cancer* (NSCLC, ca. 80-85 %) unterteilt, wobei der häufigste Subtyp der NSCLC das Adenokarzinom, gefolgt vom Plattenepithelkarzinom und den großzelligen Karzinomen ist (108). Zur Therapie der NSCLC werden, neben der chirurgischen Therapie, auch die Bestrahlung und die Chemotherapie eingesetzt. Darüber hinaus gibt es weitere therapeutische Möglichkeiten für spezifische Mutationen, wie z.B. Mutationen des *epidermal growth factor receptors* (EGFR), welche mit Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt werden können (134). Trotz der therapeutischen Möglichkeiten liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate eines Lungenkarzinoms bei ca. 19 % für Männer und 25 % für Frauen (103).

1.3 Das Protoonkogen K-Ras4B

Die Ras-Isoformen H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B werden durch die drei Gene *H-Ras*, *N-Ras* und *K-Ras* codiert (4, 16). Das Gen *K-Ras* weist die zwei alternativen Exons 4A (39 Aminosäuren) und 4B (38 Aminosäuren) auf (82). Durch alternatives Splicing dieser beiden Exons entstehen die Isoformen K-Ras4A und K-Ras4B (4, 14, 82). Die beiden Splicevarianten K-Ras4A und K-Ras4B werden in unterschiedlicher Menge exprimiert. In Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien wurde eine deutlich höhere Expression von K-Ras4B im Vergleich zu K-Ras4A nachgewiesen (121). Hierbei betrug die Expression von K-Ras4B in der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 sogar knapp über 90 % (121). Aus diesen Gründen wird in der vorliegenden Arbeit, wenn nicht anders beschrieben, mit dem Begriff K-Ras die Isoform K-Ras4B gemeint.

K-Ras besteht aus 188 Aminosäuren (AS) (78), die sich in ihrer Sekundärstruktur zu fünf α -Helices und einem zentralen sechssträngigen β -Faltblatt zusammen setzen. 10 *loops* verbinden diese α -Helices und das β -Faltblatt, von denen der *loop L1* als der *phosphate-binding loop* (P-Loop) bezeichnet wird (129). Die N-terminalen Aminosäuren 1-165 enthalten die Funktion der Nukleotidbindung und -Hydrolyse (38). Dort sind die *switch I*- (AS 30-38) und die *switch II*-Region (AS 60-76) lokalisiert (84). In den *switch*-Regionen bewirkt ein Austausch der Nukleotide eine Konformationsänderung (84). Durch die Konformationsänderung wiederum wird die Effektor-Bindungsstelle des Ras-Proteins freigelegt (97).

C-terminal besitzen die Ras-Proteine eine hypervariable Region (HVR), welche sich stark zwischen den Isoformen unterscheidet. Dort sind die CAAX-Sequenz (C= Cystein, A= aliphatische Aminosäure, X= beliebige Aminosäure) sowie die Lysin-reiche Domäne von K-Ras enthalten (41). An dieser CAAX-Sequenz finden in drei Schritten die posttranslationalen Modifikationen statt, die zur Bildung einer hydrophoben Region führen, über die K-Ras in der Plasmamembran verankert werden kann. Im ersten Schritt wird K-Ras durch die Farnesyltransferase (FTase) am Cystein der CAAX-Sequenz farnesyliert. Am Endoplasmatischen Retikulum folgt die Abspaltung der C-terminalen AAX-Sequenz durch das *ras converting enzyme-1* (RCE1) und die Methylierung der Carboxylgruppe des farnesylierten Cysteins durch die *isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase* (ICMT) (4). Für die Verankerung von K-Ras in der Plasmamembran wird auch die positiv geladene Lysin-reiche Domäne benötigt (42), die elektrostatische Bindungen mit den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran eingeht (4).

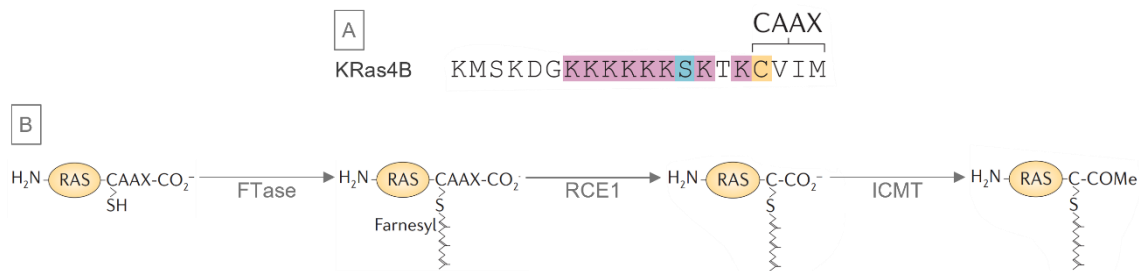


Abb. 1 A, B: Posttranslationale Modifikationen der hypervariablen Region von K-Ras4B. A: Über die Lysin-reiche Domäne (violett hinterlegt) in der hypervariablen Region wird K-Ras4B in der Plasmamembran verankert. Die posttranslationalen Modifikationen erfolgen an der CAAX-Sequenz. B: Am Cystein der CAAX-Sequenz erfolgt die Farnesylierung von K-Ras4B durch die Farnesyltransferase (Ftase). Anschließend erfolgt die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren durch das *ras converting enzyme-1* (RCE1) und die Methylierung der Carboxylgruppe des farnesylierten Cysteins durch die *isoprenylcysteine carboxylmethyl-transferase* (ICMT) (verändert nach (4); Lizenznummer: 6071331045713; reproduced with permission from Springer Nature).

Ras-Proteine wechseln zwischen ihrem aktiven und inaktiven Zustand. Im aktiven Zustand ist Guanosintriphosphat (GTP) an Ras gebunden. Da die intrinsische Hydrolysefähigkeit von Ras sehr gering ist, wird diese durch *GTPase activating proteins* (GAPs) beschleunigt (78). Die Folge ist die Abspaltung eines Phosphats, wodurch GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert wird und Ras inaktiviert wird. Da die Austauschrate von GDP zu GTP wiederum sehr niedrig ist, beschleunigen *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) diesen Vorgang. Eine Senkung der Affinität von Ras zu GDP durch GEFs führt zur Freigabe von GDP (113). Aufgrund der höheren Konzentration von GTP in den Zellen kann die frei gewordene Bindungsstelle nun von GTP besetzt werden und Ras liegt wieder im aktiven Zustand vor (113).

1.4 Die K-Ras-Mutation G12C

Durch eine Punktmutation in Kodon 12 der K-Ras-DNA kommt es zur Transversion eines Guanins zu Thymin. Das neue Triplet TGT codiert in der Folge nicht mehr für die Aminosäure Glycin (GGT), sondern nun für Cystein (123). Diese Mutation hat zur Folge, dass das mutierte K-Ras G12C in seiner aktiven Form vorliegt, da sowohl die intrinsische als auch die GAP-vermittelte GTPase Aktivität vermindert sind (49, 109).

1.4.1 Häufigkeiten von K-Ras-Mutationen in Pankreas- und Lungenkarzinomen

In der Studie von Lee *et al.* aus dem Jahr 2022 wurden über 400.000 Gewebe- oder Blutproben von Tumorpatienten gesammelt. Die Auswertung dieser Proben zeigte, dass *K-Ras* mit 23 % das am häufigsten mutierte Onkogen in allen untersuchten Tumorgeweben war. Unter allen nachgewiesenen *K-Ras*-Mutationen waren G12D (29 %), G12V (23%) und G12C (15 %) die häufigsten. Eine Aufteilung nach untersuchtem Gewebe ergab bei 35 % der NSCLC-Proben *K-Ras*-Mutationen, von

denen die K-Ras-Mutation G12C den höchsten Anteil ausmachte. Von den untersuchten PDAC-Proben wiesen 92 % eine K-Ras Mutation auf, von denen die häufigste G12D war. Die Mutation G12C konnte beim Pankreaskarzinom nur in einem sehr kleinen Teil der Proben nachgewiesen werden (71). Die Daten zum Pankreaskarzinom aus der Studie von Lee *et al.* (2022) sind übereinstimmend mit einer vorangegangenen Studie von Hruban *et al.* aus dem Jahr 1993. In den dort untersuchten Pankreaskarzinomen machte die K-Ras-Mutation G12C nur 4 % der K-Ras-Mutationen aus und G12D bildete mit 49 % den größten Anteil der K-Ras-Mutationen (47).

1.4.2 Inhibition von G12C-mutiertem K-Ras

Bei der Inhibition von K-Ras G12C und weiteren Mutationsvarianten traten zunächst Schwierigkeiten auf, da keine geeignete Bindungsstelle für Inhibitoren auf der Oberfläche von K-Ras G12C gefunden wurde und die Bindungsstelle für Nukleotide aufgrund der hohen Konzentration von GTP in der Zelle und der hohen Affinität von K-Ras zu GTP fast durchgehend besetzt ist (48). Folglich wurden andere Strategien verfolgt. Darunter waren Farnesyltransferase-Inhibitoren, die die Membranverankerung von mutiertem K-Ras verhindern sollten und Inhibitoren von Proteinen *upstream* oder *downstream* von mutiertem K-Ras, die sich jedoch als erfolglos erwiesen (48). Letztlich gelang es Ostrem *et al.* (2013) eine Bindungsstelle zu beschreiben, in der Inhibitoren kovalent an K-Ras G12C binden können. Diese *switch-II-pocket* (S-IIP), wird durch eine Konformationsänderung der *switch-II*-Region im GDP-gebundenen Zustand geformt. Im GTP-gebundenen Zustand hingegen wird die S-IIP von Anteilen der *switch-II*-Region ausgefüllt (91). Nun konnten Inhibitoren entwickelt werden, die durch Bindung an K-Ras G12C dieses im inaktiven Zustand halten. Die Bindung dieser Inhibitoren führte zu einer höheren Bindungsaffinität von K-Ras G12C zu GDP über GTP (91). Da die intrinsische GTPase-Aktivität von K-Ras G12C zwar vermindert, aber noch vorhanden ist (49), ist eine Bindung von K-Ras G12C im GDP-gebundenen Zustand möglich.

Einer dieser Inhibitoren ist das *small molecule* AMG510 (IUPAC-Formel: (1*R*)-6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)-1-[4-methyl-2-(1-methylethyl)-3-pyridinyl]-4-[(2*S*)-2-methyl-4-(1-oxo-2-propen-1-yl)-1-piperazinyl]-pyrido[2,3-*d*]-pyrimidin-2(1*H*)-one; C₃₀H₃₀F₂N₆O₃ (69)). Diese Substanz bindet an mutiertes K-Ras G12C indem es sich unter anderem in die beschriebene S-IIP legt, eine kovalente Bindung mit dem mutierten Cystein eingeht und eine weitere Tasche besetzt, die sogenannte *cryptic pocket*, die aus Anteilen des Tyrosin-96 (Y96), Histidin-95 (H95) und Glutamin-99 (Q99) besteht (69). Erste *in vitro*-Versuche mit K-Ras G12C-mutierten Zellen zeigten, dass die Behandlung mit AMG510 zu einer reduzierten Aktivität Ras-abhängiger Signalwege und einer verminderten zellulären Lebensfähigkeit führt (12). Der Einfluss von AMG510 wurde

auch *in vivo* mit xenotransplantierten Mäusen untersucht, bei welchen unter AMG510-Einfluss ein Rückgang der Tumorgroße beobachtet werden konnte (12). Auf die ersten erfolgsversprechenden Versuche *in vitro* und *in vivo* folgten klinische Studien. Die erste Phase I-Studie von AMG510 (CodeBreak100, NCT03600883) umfasste 129 Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten K-Ras G12C-mutierten Karzinomen, die bereits eine Therapie erhalten hatten. Es wurden verschiedene Karzinome eingeschlossen, darunter 59 Patienten mit NSCLC und 12 Patienten mit Pankreaskarzinomen. Bei insgesamt 32,2 % der Patienten mit NSCLC konnte ein komplettes oder teilweises Ansprechen der Erkrankung auf die Therapie verzeichnet werden. Die dabei häufigsten Nebenwirkungen waren vor allem Diarrhö, Fatigue und Übelkeit (46). In der darauffolgenden Phase II-Studie (NCT03600883), bei welcher Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder metastasierten K-Ras G12C-mutierten NSCLC die höchste Dosis der vorangegangenen Phase-I-Studie verabreicht wurde, konnte bei 82,3 % der Patienten eine Verkleinerung des Tumors nachgewiesen werden (114). Es folgte die Phase III-Studie CodeBreak200 (NCT04303780), welche das Chemotherapeutikum Docetaxel mit AMG510 verglich (10). AMG510 wurde mittlerweile unter dem Wirkstoffnamen Sotorasib und unter dem Handelsnamen Lumakras®, entwickelt von der Firma Amgen zur Therapie von lokal fortgeschrittenen oder metastasierten K-Ras G12C-mutierten NSCLC in den USA zugelassen. Die Therapie darf dort bei Erwachsenen angewendet werden, die vorher mindestens eine Systemtherapie erhalten haben (10, 75).

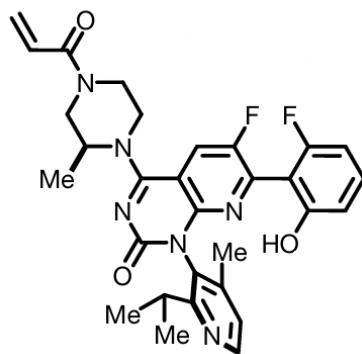


Abb. 2: Strukturformel des K-Ras G12C-Inhibitors AMG510 (entnommen aus (12); Lizenznummer: 6071340334204, reproduced with permission from Springer Nature).

Neben AMG510 steht MRTX849 (IUPAC-Formel: 2- [(2S)- 4- [7- (8- chloronaphthalen-1-yl)- 2- [[[(2S)- 1- methylpyrrolidin- 2- yl]methoxy]- 6,8- dihydro- 5H- pyrido[3,4-d] pyrimidin- 4- yl]- 1- (2- fluoroprop- 2- enoyl)piperazin- 2- yl]acetonitrile; C₃₂H₃₅ClFN₇O₂ (98)) als weiterer *small molecule*-Inhibitor zur Verfügung (89). Über eine kovalente Bindung mit dem mutierten Cystein bindet MRTX849 ebenfalls spezifisch an

K-Ras G12C (29). Die Bindung von MRTX849 an K-Ras G12C erfolgt im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, in welchem K-Ras G12C dann festgehalten wird (40). Initiale Untersuchungen der Inhibition von K-Ras G12C mit MRTX849 *in vitro* und *in vivo* deuteten auf eine erfolgreiche Bindung und Inhibition des mutierten Proteins hin (40). Nach den erfolgreichen *in vivo*-Versuchen wurde auch MRTX849 folglich in klinischen Studien weiter getestet. In der Phase I/IB-Studie (KRYSTAL-1, NCT03785249) zeigten sich bei 92 % der Patienten Nebenwirkungen, darunter vor allem Übelkeit, Durchfall und Erbrechen. Die Ansprechrquote nach einer Nachsorgezeit von 19,6 Monaten lag allerdings bei 53,3 % (93). Weiterhin wurde eine Phase II-Studie (NCT03785249) mit der aus der Phase I/IB Studie evaluierten Dosis von zweimal täglich 600 mg *per os* durchgeführt. Hierbei lag das objektive Ansprechen bei 42,9 % (53). Weiterführende klinische Studien zu beiden K-Ras G12C-Inhibitoren wurden initiiert. Darunter auch Phase-III-Studien (105).

Mittlerweile wurde auch MRTX849 in den USA unter dem Wirkstoffnamen Adagrasib (KRAZATI®), von der Firma Mirati entwickelt, im Dezember 2022 zur Therapie von Erwachsenen mit lokal fortgeschrittenen oder metastasierten NSCLC mit einer K-Ras G12C-Mutation zugelassen. Dabei muss vorher mindestens eine Systemtherapie erfolgt sein (136).

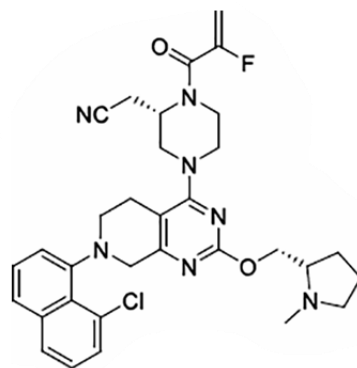


Abb. 3: Strukturformel des K-Ras G12C-Inhibitors MRTX849 (entnommen aus (89); *with permission from Elsevier*, Lizenznummer: 6071341321023).

1.5 Beschreibung einiger Ras-abhängiger intrazellulärer Signalwege

Intrazelluläre Signalwege können durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung des *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) durch Bindung des *Epidermal growth factor* (EGF) als seinen Liganden. Nach Bindung von EGF an seinen Rezeptor folgt die Dimerisierung zweier Ligand-Rezeptor-Komplexe (73). Nach Autophosphorylierung des EGFR durch die rezeptoreigene Tyrosinkinase kann das Adapterprotein *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) binden. An Grb2

bindet nun der GEF *Son of Sevenless* (SOS) und aktiviert Ras durch Austausch von GDP zu GTP (35).

GTP-Ras kann zentrale Signalwege der Zelle beeinflussen, wie z.B. den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Zu Beginn dieses Signalwegs steht die Aktivierung von Raf durch GTP-Ras. Raf aktiviert nun über Phosphorylierung die *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), welche wiederum die *Extracellular signal related kinase 1 und 2* (ERK1/2) durch Phosphorylierung an Threonin185 und Tyrosin187 aktiviert (70). ERK1/2 sind auch unter dem Namen p42MAPK und p44MAPK bekannt (138). Nach Aktivierung von ERK1/2 dimerisiert dieses und aktiviert intranukleär Transkriptionsfaktoren, kann aber auch Einfluss auf die Translation nehmen. Dadurch nimmt ERK1/2 eine zentrale Rolle für die Proliferation, Migration und das Wachstum der Zellen ein (70).

Ein weiteres Substrat von Ras ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). GTP-Ras bindet PI3K an ihrer katalytischen Untereinheit p110 (104). Die Aktivierung der PI3K kann durch Ras, aber auch direkt durch Rezeptortyrosinkinasen erfolgen (62). Die aktivierte PI3K phosphoryliert nun an der Plasmamembran Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) (80). Die Phosphatasen PTEN und *Src-homology 2-containing phosphatases 1 und 2* (SHIP1 und SHIP2) gelten als Gegenspieler der PI3K. PTEN dephosphoryliert PIP₃ zu PI(4,5)P₂. SHIP1 und SHIP2 dephosphorylieren PIP₃ zu PI(3,4)P₂, welches allerdings nur zu einer verminderten Signaltransduktion führt (13). Die Weiterleitung des Signals von PI3K an intrazelluläre Signalwege gelingt durch die Kinase Akt, welche in drei Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) vorkommt und auch als Proteinkinase B bekannt ist (80). Akt kann über ihre Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne an PIP₃ binden und liegt so an der Plasmamembran lokalisiert vor. Dort kann die Kinase nun durch die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) und den *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2-Komplex) an einem Serin- bzw. Threoninrest phosphoryliert werden. Für die maximale Aktivierung von Akt sind beide Phosphorylierungen notwendig (80). Die Komplexität der Signalwege wird durch die enorme Anzahl von Akt-Substraten deutlich. Es wurde von über 100 Substraten berichtet (80). Aktives Akt hat durch diese verschiedenen Substrate einen positiven Einfluss auf den Metabolismus, das Wachstum und das Überleben der Zellen. Akt phosphoryliert und inhibiert pro-apoptotische Faktoren und verhindert die Transkription pro-apoptotischer Gene (7). Das Zellwachstum kann Akt über *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) regulieren, welches die *p70 ribosomal protein S6 kinase* (p70 S6K) phosphoryliert. P70 S6K wiederum phosphoryliert das ribosomale Protein S6, das die Translation von ribosomalen Proteinen steigert. Über den Einfluss von mTOR auf *Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1,2 und 3* kann die Translation in der Zelle gesteigert werden (7).

Akt kann weiterhin über die Phosphorylierung von Isoformen der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), GSK3 α (51kDa) und GSK3 β (47 kDa), an Serin21 (GSK3 α) oder Serin9 (GSK3 β) diese inhibieren (54). Die Kinase GSK3 besitzt über ihre vielen Substrate wiederum einen Einfluss auf eine Vielzahl von Zellfunktionen. So werden beispielsweise das Schlüsselenzym der Glykogensynthese und Transkriptionsfaktoren wie c-myc durch die GSK3 reguliert (54).

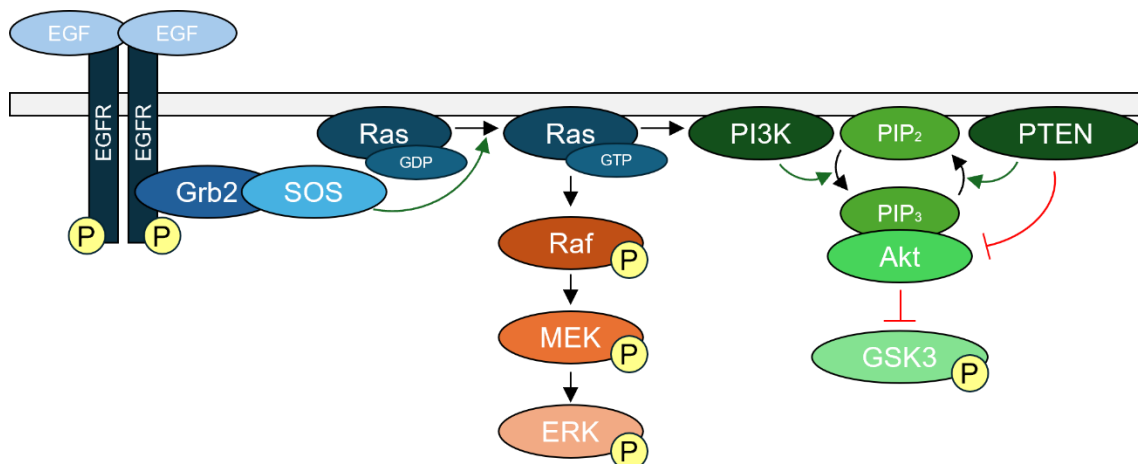


Abb. 4: Aktivierung Ras-abhängiger Signalwege. Nach Aktivierung des EGF-Rezeptors kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung, woraufhin sich das Adapterproteine Grb2 anlagert. Der GEF SOS bewirkt nach Bindung an Grb2 die Aktivierung von Ras durch Austausch von GDP zu GTP. Ras kann nun die intrazellulären Signalkaskaden der hier abgebildeten Raf-MEK-ERK- und PI3K-Akt-Signalkaskade aktivieren und wichtige Zellfunktionen beeinflussen (P=Phosphorylierung; erstellt mit PowerPoint (Microsoft)).

Ein weiterer Signalweg, in welchem GSK3 involviert ist, ist der β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg. Hierbei wird ein Komplex aus mehreren Proteinen gebildet, in dem u.a. GSK3 und β -Catenin enthalten sind (88). Ohne einen extrazellulären Stimulus eines Wnt-Liganden wird β -Catenin durch u.a. GSK3 phosphoryliert und in der Folge abgebaut. Durch den Stimulus eines Wnt-Liganden wird β -Catenin nicht mehr phosphoryliert, was zu dessen Akkumulation im Nukleus führt (88). Durch Bindung von β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der *T-cell factor*- (TCF) und *lymphoid enhancer binding factor* (LEF)-Familie kommt es zur Transkription von Genen (88, 135). Darunter sind Gene, über die die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beeinflusst werden kann, wie beispielsweise Snail1 (135).

Die Expression von onkogenem K-Ras beeinflusst ebenfalls die Genexpression epithelialer und mesenchymaler Markerproteine. Fensterer *et al.* (2004) zeigten dies anhand einer reduzierten Genaktivität epithelialer Markerproteine, wie Zytokeratin 18 und 19 sowie einer erhöhten Transkription des nicht-epithelialen Proteins N-Cadherin in K-Ras G12V-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (30). Darüber hinaus

konnte in Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaudia Giehl gezeigt werden, dass die Expression von onkogenem K-Ras V12 zu einem vermehrt fibroblastoiden Phänotyp sowie zu einer erhöhten Zellmotilität und -Invasivität führt (27). Im Zusammenhang mit diesen morphologischen Veränderungen wurde auch gezeigt, dass onkogenes K-Ras V12 das Zytoskelett moduliert (27).

1.6 Aufbau des zellulären Zytoskeletts

Das zelluläre Zytoskelett hat neben der form- und stützgebenden Funktion eine bedeutende Funktion für die Adhäsion, Motilität und Metastasierung von Tumorzellen (21). Aktinfilamente (6-8 nm), Intermediärfilamente (10 nm) und Mikrotubuli (25 nm) bilden das zelluläre Zytoskelett (52), wobei die Zusammensetzung der Intermediärfilamente je nach Gewebe variiert. Epitheliale Zellen bilden beispielsweise mehr Zytokeratin, während mesenchymale Zellen mehr Vimentin exprimieren (63).

1.6.1 Aufbau von Intermediärfilamenten

Intermediärfilamente bestehen aus einer zentralen α -helikalen *Rod*-Domäne, an die N- und C-terminal nicht- α -helikale Domänen grenzen. Die α -Helix besitzt eine Heptad-Sequenz mit einer hydrophoben Aminosäure an Position 1 und 4. Über die α -Helix dimerisieren die Monomere zu einer doppelgewundenen *coiled-coil*. Zwei dieser Dimere lagern sich wiederum antiparallel und halbversetzt zu Tetrameren zusammen (45). Darauf folgt die laterale Anlagerung der Tetramere zu *unit length filaments*, die dann durch longitudinale Anlagerung Filamente bilden. Im letzten Schritt werden diese Filamente in ihrem Durchmesser kompakter und es entstehen die reifen Filamente (115).

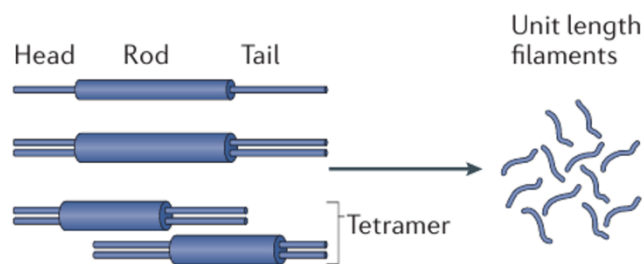


Abb. 5: Aufbau der Intermediärfilamente. Ein Intermediärfilament-Monomer besteht aus einer zentralen *Rod-Domäne*, die N- und C-terminal von den nicht α -helikalen *head*- bzw. *tail*-Domänen begrenzt wird. Zwei Intermediärfilament-Monomere dimerisieren zunächst zu einer *coiled coil*. Zwei *coiled coils* wiederum lagern sich halbversetzt zu einem Tetramer zusammen. Nach Anlagerung der Tetramere zu *unit length filaments*, bilden diese zunächst kurze Filamente, die über longitudinale und radiale Anlagerung wachsen (modifiziert nach: (115); Lizenznummer: 6071350056871; reproduced with permission from Springer Nature).

1.6.2 Das Intermediärfilament Vimentin

Vimentinfilamente gehören zu den Typ III-Intermediärfilamenten. Sie können Zellorganellen positionieren, die Zellform regulieren und sie helfen die Zelle an mechanischen Stress anzupassen (77). Die Filamentbildung kann durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Stellen reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass z. B. die Kinase Akt an Vimentin bindet und durch Phosphorylierung von Vimentin an Serin38 die Filamente vor dem Abbau schützt (140). Neben Serin38 wurde von weiteren Phosphorylierungsstellen berichtet, die teilweise von mehreren Kinasen phosphoryliert werden können (50). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Vimentin auch als Phosphataufbewahrung genutzt werden kann (65).

Ein intaktes Vimentinfilament-Netzwerk wird zur Migration und Invasion von Tumorzellen benötigt (8). Verdeutlicht wird dies anhand einer Untersuchung von menschlichen Lungenkarzinomen, in denen beobachtet wurde, dass Vimentin-positive Tumorzellen bevorzugt in Bereichen des Tumors lokalisiert sind, die ein invasives Wachstum aufweisen (22). Eine erhöhte Invasivität und Migrationsfähigkeit kann auch durch die Expression von onkogenem K-Ras induziert werden (58). Darüber hinaus hat onkogenes K-Ras Einfluss auf den Vimentin-Proteingehalt (58). Kim *et al.* (2015) publizierten, dass die Expression von exogenem K-Ras G13D in Brustkrebszellen zu einem höheren Vimentin-Proteingehalt bei gleichzeitig verminderter E-Cadherin-Expression führt (58).

1.6.3 Das Intermediärfilament Keratin

Keratinfilamente dienen der mechanischen Stabilität von Zellen im Zellverband (87) und können die Bewegung von Zellorganellen und die Zellmotilität beeinflussen (127). Die insgesamt 54 humanen Zytokeratine werden in zwei Typen unterteilt, von denen Typ I-Zytokeratine kleiner (40-65.5 kDa) und saurer (pH 4,5-6) als die Typ II-Zytokeratine (50-70 kDa; pH 6,5-8,5) sind (52). Die Bildung der Keratinfilamente beginnt in der Zellperipherie. Von dort wandern sie in Richtung des Zellkerns, während sie in ihrer Länge wachsen und sich schließlich in das bestehende Keratinfilamentsystem integrieren (128). Der Transport findet dabei entlang von Aktinfilamenten statt (60). Einige Keratinfilamente zerfallen wieder in lösliche Oligomere, die durch Diffusion in die Zellperipherie gelangen und wiederum in das Netzwerk integriert werden können (61). Dreissigacker *et al.* (2006) haben gezeigt, dass das Keratin-Filamentnetzwerk durch die Expression von onkogenem K-Ras V12 beeinflusst wird (27). Der Einfluss von onkogenem K-Ras auf das Intermediärfilament Keratin findet auch auf transkriptioneller Ebene statt, da eine reduzierte Genexpression von *KRT18* und *KRT19* (Zytokeratin 18 und 19) durch die Expression von K-Ras G12V nachgewiesen werden konnte (30).

1.6.4 Das Aktinzytoskelett und Aktin-assoziierte Proteine

Aktinfilamente besitzen mit 6-8 nm den geringsten Durchmesser der Zytoskelett-Filamente (52) und liegen entweder als monomeres, globuläres G-Aktin oder in Filamenten gebunden als filamentöses F-Aktin vor (21). Die Polymerisation der Aktinfilamente läuft nach der sogenannten *Head to tail polymerization* ab (126). Für die Zellmotilität in zweidimensionaler Richtung ist die Ausbildung von aktinreichen Membranausstülpungen von Bedeutung. Dies sind die stäbchenförmigen Filopodien mit dicht gepackten Aktinfilamenten, die die Zellumgebung invadieren und die flachen Lamellipodien, welche ein verzweigtes Aktinfilament-Netzwerk beinhalten und als zentrale Struktur für die Zellbewegung beschrieben werden (133). Die Aktinfilamente können sich weiterhin zu dicken Bündeln zusammenlagern, die auch als Stressfasern bezeichnet werden. Diese können in dorsale und ventrale Stressfasern unterschieden werden. Die ventralen Stressfasern durchziehen die Zellen und enden auf beiden Seiten in einem Fokalkontakt, während dorsale Stressfasern nur in einem Ende der Zellen in einem Fokalkontakt enden (11). Mit den dorsalen Stressfasern stehen *transverse arcs* in Verbindung, die der Kraftübertragung dienen (120). Zusätzlich können perinukleäre Aktinfasern als Form der ventralen Aktinfasern betrachtet werden. Sie überspannen den Zellkern und enden ebenfalls mit beiden Enden in fokalen Kontakten (11). Es wurde bereits gezeigt, dass onkogenes K-Ras die Bildung von Aktin-Stressfasern beeinflusst (27, 96). Die Expression von onkogenem K-Ras V12 führte zu einer reduzierten Bildung von Stressfasern (27), während die Deletion von endogenem K-Ras G13D zur Ausbildung von Aktinstressfasern führte (96). Dabei wurde in K-Ras G13D-deletierten Zellen auch eine größere Anzahl an fokalen Kontakten beobachtet, verglichen mit K-Ras G13D-exprimierenden Zellen (96). Fokalkontakte dienen der Verankerung des Aktinzytoskeletts mit der extrazellulären Matrix. Hierfür werden die Aktinfilamente über Adapterproteine, darunter u.a. Vinkulin, Talin und Paxillin, mit dem zytoplasmatischen Ende von Integrinen verbunden, die die Plasmamembran nach extrazellulär durchspannen (95). Ein weiteres Protein, das mit Aktin assoziiert ist, ist Palladin. Drei Isoformen dieses Proteins mit unterschiedlicher Größe (90 kDa, 140 kDa, 200 kDa) sind bekannt (24). Palladin bindet an Aktinfasern und führt zu deren Quervernetzung (24). Zudem wurde Palladin als Substrat von Akt1 identifiziert (19).

1.6.5 Aufbau interzellulärer Kontakte

Adherens junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die in epithelialen Zellen der polaren Differenzierung dienen können. Transmembranäre, calciumabhängige Cadherine bilden in *Adherens junctions* Dimere, die über ihre extrazelluläre Domäne an Cadherine benachbarter Zellen binden (37). Ein Vertreter dieser Cadherine ist E-Cadherin, welches

vor allem in epithelialen Zellen exprimiert wird (37). Intrazellulär besitzt E-Cadherin eine *catenin binding domain* (94). Hierüber bindet β -Catenin, an welches wiederum α -Catenin bindet (1). Über die Bindung von α -Aktinin an α -Catenin kann die Verbindung zum Aktinzytoskelett hergestellt werden (59). Allerdings kann Aktin auch direkt an α -Catenin binden (37). Zur Stabilisierung von E-Cadherin kann p120Catenin dieses an seiner Juxtamembrandomäne binden (132). Infolgedessen wird E-Cadherin stabilisiert, was zur Ausbildung von starken Adhäsionskontakten führt (51). Wenn p120Catenin an E-Cadherin gebunden ist, liegt es nicht mehr diffus verteilt in der Zelle vor, sondern konzentriert sich auf Zell-Zell-Kontakte (118). Von p120Catenin sind 32 Isoformen bekannt, die durch vier verschiedene Startpunkte der Translation und zusätzlichem alternativem Splicing der Exone A (Exon 18), B (Exon 20) und C (Exon 11) entstehen (57).

1.7 Die epithelial-mesenchymale Transition

Der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beschreibt den Übergang von epithelialen, polarisierten und im Zellverband verankerten Zellen hin zu mesenchymalen Zellen, die sich aus dem Zellverband lösen können und eine erhöhte Invasivität und Migrationsfähigkeit besitzen (55, 68). Dieser Prozess ist nicht nur während der Embryogenese und Wundheilung von Bedeutung, sondern spielt auch eine zentrale Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen, in denen EGF, *transforming growth factor β* (TGF- β) und weitere Faktoren aus dem tumorassoziierten Stroma eine EMT induzieren können (55). In Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass eine EMT-Induktion mittels TGF- β zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und damit einhergehend zu Veränderungen der Zellmorphologie (90) sowie zu erhöhter Motilität und Invasivität führt (67). An der Fortleitung des Signals von TGF- β innerhalb der Zelle ist der PI3K-Akt-Signalweg involviert (67). Im Prozess der EMT sind außerdem Transkriptionsfaktoren beteiligt (u.a. Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1 und Snail) (131). Die Transkription von Snail1 kann beispielsweise durch β -Catenin im Nukleus bewirkt werden (135). Snail wiederum hemmt die Transkription des E-Cadheringens (131). Eine verminderte Expression von epithelialen Markerproteinen, wie E-Cadherin und Zytokeratinen und eine vermehrte Expression von mesenchymalen Markern, beispielsweise Vimentin und N-Cadherin ist charakteristisch für Zellen, die eine EMT durchlaufen (122). Die K-Ras G12C-Inhibitoren können ebenfalls Prozesse der EMT beeinflussen, wie Adachi *et al.* (2023) anhand einer zytoplasmatischen Relokalisation von E-Cadherin in MRTX849- und AMG510-behandelten K-Ras G12C-mutierten NSCLC-Zellen zeigten (3). Dass die EMT kein starrer Prozess ist, wird anhand der Reversibilität der zytoplasmatischen Umverteilung von E-Cadherin nach Entzug von

AMG510 deutlich (3). Die Umkehrung der EMT, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) kann wiederum zur Ausbildung von Metastasen führen, die dem Primärtumor ähneln (55).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die molekular-strukturelle Analyse der *switch-II-pocket* in der GTPase K-Ras G12C führte zur Entwicklung von Inhibitoren, die kovalent an Cystein im mutierten K-Ras G12C binden und dieses im inaktiven Zustand festhalten. Dies eröffnete neue Therapiestrategien zur Behandlung von Karzinomen mit einer K-Ras G12C-Mutation, welche vor allem bei NSCLC sehr häufig auftritt.

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels biochemischer Verfahren der Einfluss zweier irreversibler Inhibitoren von K-Ras G12C auf intrazelluläre Signalwege untersucht werden. Als zentrale, Ras-abhängige Signalwege sollten der Ras-Raf-MEK-ERK- und der PI3K-Akt-Signalweg im Immunoblot-Verfahren in je einer NSCLC-Zelllinie mit homo- bzw. heterozygoter K-Ras G12C-Mutation untersucht werden.

Weiterhin sollte die Auswirkung der irreversiblen K-Ras G12C-Inhibition auf das zelluläre Zytoskelett und die Zellmorphologie untersucht werden, um mögliche Hinweise auf Veränderungen im Prozess der EMT und damit einhergehende potenziell erhöhte bzw. verminderte Invasivität der Tumoren zu erlangen. Zum Vergleich zu den NSCLC-Zelllinien sollte eine homozygot K-Ras G12C-mutierte Pankreaskarzinomzelllinie untersucht werden. Für eine Analyse der veränderten Expression von Zytoskelettproteinen wurde das Immunoblotverfahren genutzt. Veränderungen der Zellmorphologie und des zellulären Zytoskeletts sollten im Immunfluoreszenzverfahren detektiert werden. Da Vimentin ein wichtiger mesenchymaler Marker ist, sollte zudem der Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Vimentin-Genexpression in Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1 zeigt die in der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Chemikalien.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck Millipore, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
<i>Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Fötales Kälber Serum (FCS)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Steriles Wasser (steriles H_2O)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isobutanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck Millipore, Darmstadt
Kupfer-(II)-Sulfat	ChemPUR, Karlsruhe
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver <i>Blotting Grade</i>	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	AppliChem, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natrium- β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
nicht essenzielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Oligo d(T) ₂₃ VN Primer	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Pefabloc SC	SERVA, Heidelberg

Pierce® <i>BCA-Protein-Assay-Reagent A</i>	Pierce, Rockford, USA
Polysorbat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinder Serum Albumin (BSA)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Rotiphorese® Gel A (30 % Acrylamidlösung)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel B (2 % Bisacrylamidlösung)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SuperSignal™ West Pico Plus <i>Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Scientific, Dreieich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
<i>Trypsininhibitor from Soybean (STI)</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
96-Well PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Adhesive clear PCR Seal Sheets</i>	Biozym, Hessisch Oldendorf
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filterpipettenspitzen 10 µL; 20 µL; 200 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen 26 G (0,45 mm x 16 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Nitrocellulosemembran Protran 0,45 µm	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Pipetboy IBS acu 2	Integra Biosciences, Bibertal
Pipettenspitzen 10 µL; 20 µL; 200 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µL	Greiner BioOne, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 15 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg

Steritop Filter Zellkultur	Merck Millipore, Darmstadt
Tuberkulin-Spritze 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Whatman-Chromatographie-Papier	GE Healthcare, München
Zellkulturplatte 6-Well; 12-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschale 6 cm; 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Geräte

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Absaugsystem <i>Fast Biontec Topstream</i>	FastBiontec, Frankfurt
Blotkammer	C.B.S. Scientific Co, San Diego, CA, USA
CO ₂ -Inkubator HERAccl 150i	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Elektrophoresekammer <i>BlueMarine™ 100</i>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>ELx800 Absorbance Microplate Reader</i>	Biotek, Bad Friedrichshall
Feinwaage <i>Analytical Balance A200S</i>	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Fusion-SL4-3500 WL (<i>Chemiluminescence Imaging system</i>)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelgießständer (4 Gele)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>HeatSealer S100</i>	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	VWR International GmbH, Darmstadt
Heraeus Inkubator	Thermo Scientific, Dreieich
<i>Heraeus Labofuge400 FunctionLine</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Odyssey CLx (<i>Infrared Imaging System</i>)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Odyssey SA (<i>Infrared Imaging System</i>)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Magnetrührer MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Lancing England
Olympus IX81, Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
PAULA <i>cell imager</i>	Leica Microsystems, Wetzlar
pH-Messgerät (Standard) <i>five easy</i>	Mettler Toledo, Gießen
Pipetman Pipetten 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson, Middleton, USA

Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Spannungsgerät Consort EV243, EV245	Consort bvba Turnhout, Belgien
Sprout mini centrifuge	Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA
Sterilfilter Millex-GS	Merck Millipore, Darmstadt
Stratagene Mx3005P <i>real time PCR cyclers</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
Ultraschallreiniger Transsonic T310	ELMA Sonic, Singen
Waage Sartorius 1264 MP	Sartorius Lab Instruments, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem <i>Barnstead GenPure</i>	Thermo Scientific, Dreieich
Werkbank <i>Flow MSC-Advantage</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Wippschüttler <i>ELMI Skyline DRS-12</i>	Elmi Europe, Riga, Lettland
Wippschüttler Heidolph DuoMax1030	Heidolph Instruments, Schwabach
X-Cite Series 120PC	Olympus, Hamburg

2.1.4 Software

In Tabelle 4 sind die verwendeten Softwares aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Softwares.

Software	Hersteller
AnalySIS 3.2	EMSIS GmbH, Münster
CellSens Dimension 1.6	Olympus, Hamburg
Citavi 6.14	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Fiji (ImageJ) 1.54p	National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA
Fusion SL Version 15.18	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism 10.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageStudio™ Version 5.2	LI-COR Bioscience, Bad Homburg
Microsoft Excel 2021	Microsoft, München
Microsoft PowerPoint 2021	Microsoft, München
Microsoft Word 2021	Microsoft, München
qPCR Software MxPro Version 4.1	Agilent Technologies, Waldbronn

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Folgende Kits wurden für die Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten molekularbiologischen Kits.

Molekularbiologische Kits	Hersteller
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
QuantiTect SYBR Green PCR Mix	Qiagen, Hilden

2.1.6 qRT-PCR-Primer

Mittels qRT-PCR wurde die Vimentin-Genexpression analysiert. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *RPLP0* (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) untersucht.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer der qRT-PCR.

Primer	Hersteller	Bestellnummer	Sequenz
Hs_RPLP0_1_SG	Qiagen, Hilden	QT00075012	Sequenz nicht verfügbar
Hs_VIM_1_SG	Qiagen, Hilden	QT00095795	Sequenz nicht verfügbar

2.1.7 Lösungen und Puffer

In Tabelle 7 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen.

Kulturmedium: DMEM 10 % (V/V) FCS 1 % (V/V) GlutaMAX™ Supplement 1 % (V/V) nicht essenzielle Aminosäuren	1 x Lösung
Kalzium und Magnesium freie-Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (CMF-PBS; 1 x): 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄	1 x Lösung pH 7,4
2 x Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer (RIPA-Puffer): 100 mM Tris pH 7,2 300 mM NaCl 0,2 % SDS (V/V) 1 % Natriumdeoxycholat (m/V) 2 % Triton X-100 (m/V)	2 x Lösung
100 x Proteaseinhibitor-Mix (PI-Mix) (Verdünnung: 1:100) 40 mg Pefabloc 10 mg Aprotinin 1 mg Leupeptin 100 mg STI 50 mM Tris	100 x Lösung pH 7,4

Phosphatase-Inhibitor: 10 mM Natriumpyrophosphat 25 mM Natrium-β-Glycerophosphat 2 mM Natrium-Orthovanadat 10 mM NaF	1 x Lösung
10 x Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (KRH-Puffer): 205 mM HEPES 1 M NaCl 50 mM KCl 100 mM KH ₂ PO ₄ 12 mM MgSO ₄	10 x Lösung pH 7,4
1 x Tritonpuffer: 10x Krebs-Ringer-HEPES-Puffer verdünnen mit: 2 mM CaCl ₂ 0,5 % Triton (m/V) 300 mM Saccharose Protease-Inhibitoren Phosphatase-Inhibitoren	1 x Lösung pH 7,4
2 mg/ mL bovines Serumalbumin-Lösung (BSA-Lösung): 40 mg BSA in 20 mL Milli-Q (Reinstwasser)	1 x Lösung
Bicinchoninsäure-Färbereagens (BCA-Färbereagens): 50 Volumenanteile <i>Pierce BCA-Protein Assay Reagent A</i> 1 Volumenanteil 4 % Kupfer-II-Sulfat-Lösung	1 x Lösung
H₂O-gesättigtes Isobutanol: 40 mL Isobutanol mit 8 mL H ₂ O gesättigt	1 x Lösung
1 x SDS-Laufpuffer: 50 mM Tris 0,5 M Glycin 0,1 % SDS (m/V)	1 x Lösung
5 x SDS-Probenpuffer: 0,2 M Tris 1 M Saccharose 5 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 1 mM DTT 2 % SDS (m/V) 0,1 % Bromphenolblau	5 x Lösung pH 8,8
Transferpuffer: 25 mM Tris 1,5 % Glyzin (m/V) 0,1 % SDS (m/V) 20 % Methanol (V/V)	1 x Lösung
Ponceau-S-Lösung: 0,2 % Ponceau-Rot (m/V) 3 % Trichloressigsäure (V/V)	1 x Lösung
Tris-buffered saline (TBS): 10 mM Tris 150 mM NaCl	1 x Lösung

Tris buffered saline-Tween® 20 (TBS-T): 0,1 % Tween (m/V) in 1x TBS	1 x Lösung
1 mM CaCl₂ in TBS: 1 mM CaCl ₂ in 1x TBS	1 x Lösung
Elvanol-Lösung: 10 % Mowiol 4-88 (m/V) 25 % Glyzin (m/V) 0,1 M Tris	1 x Lösung pH 8,5

2.1.8 Marker für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Als Größenmarker für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Artikelnummer: 26616) von Thermo Fisher Scientific, Langenselbold mit folgenden Molekulargewichtsgrößen verwendet: 180 kDa, 150 kDa, 96 kDa, 72 kDa, 60 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa.

2.1.9 Wachstumsfaktoren

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Wachstumsfaktor *Epidermal Growth Factor* (EGF; PeproTech, Hamburg; #AF-100-15) in einer Konzentration von 30 ng/mL verwendet. Hierfür wurde die Stammlösung des Wachstumsfaktors (100 µg/mL in Milli-Q-H₂O) zunächst 1:10 in Milli-Q-H₂O verdünnt. Diese Lösung wurde im verwendeten Kulturmedium weiterverdünnt.

2.1.10 Inhibitoren und Verdünnungsmittel

In Tabelle 8 sind die verwendeten Inhibitoren aufgelistet. Das in der vorliegenden Doktorarbeit verwendete Volumen von DMSO entsprach dem Volumen der verwendeten Inhibitorlösung.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt	A3672
AMG510 (Sotorasib) Stammlösung: 10 mM in DMSO	MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA	HY-114277
MRTX849 (Adagrasib) Stammlösung: 1 mM in DMSO	MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA	HY-130149

2.1.11 Zelllinien

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgelistet. Die Lungenkarzinomzelllinie H23 besitzt eine heterozygote Mutation (G12C/WT), die Zelllinie HCC-44 eine homozygote Mutation im Kodon 12 des K-Ras-Gens (G12C/G12C) (85). Die Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 besitzt eine homozygote Mutation im Kodon 12 des K-Ras-Gens (G12C/G12C) (36). Die Beschreibung der Zelllinien wurde aus den offiziellen Angaben der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA 20108, USA) und der DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) entnommen.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Zelllinien. WT= *wild type*.

Zelllinie	Beschreibung der Zelllinie	Referenz	Bestellnummer
HCC-44	Epitheliale Zelllinie aus einem humanen nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom einer 54-jährigen Frau (Adenokarzinom). <i>K-Ras</i> -Mutationsstatus: G12C/G12C	DMSZ	ACC 534
NCI-H23	Epitheliale Zelllinie aus einem humanen nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom eines 51-jährigen Mannes (Adenokarzinom). <i>K-Ras</i> -Mutationsstatus: G12C/WT	ATCC	CRL-5800
MIA PaCa-2	Epitheliale Zelllinie aus einem humanen Pankreaskarzinom eines 65-jährigen Mannes. <i>K-Ras</i> -Mutationsstatus: G12C/G12C	DMSZ	ACC 733

2.1.12 Primäre Antikörper für Immunoblotting und Immunfluoreszenz

Tabelle 10 zeigt eine Auflistung der verwendeten primären Antikörper.

Tabelle 10: Auflistung der primären Antikörper für Immunoblotting und Immunfluoreszenz. mk= monoklonal; pk= polyklonal; IF= Immunfluoreszenz).

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
E-Cadherin (24E10)	Kaninchen (pk)	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	3195S
Phalloidin-Alexa488	-	1:600 (IF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P-1951
GAPDH	Maus (mk)	1:2000	Acris Antibodies GmbH, Herford	ACR001P
GAPDH	Kaninchen (pk)	1:5000	Rockland, Limerick, PA, USA	600-401-A33
GSK3β	Maus (mk)	1:1500	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9832

KRas-2B	Kaninchen (pk)	1:50 (IF)	Proteintech, Planegg-Martinsried	16155-1-AP
KRas-2B	Kaninchen (pk)	1:2000	Proteintech, Planegg-Martinsried	16155-1-AP
p120Catenin	Kaninchen (pk)	1:1000	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg	1101
p42/44 MAPK (ERK1/2)	Maus (mk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	4696
Palladin	Kaninchen (pk)	1:2000	Proteintech, Planegg-Martinsried	10853-1-AP
Palladin	Kaninchen (pk)	1:200 (IF)	Proteintech, Planegg-Martinsried	10853-1-AP
panAkt	Maus (mk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2920S
panKeratin (Keratin 5)	Kaninchen (pk)	1:200 (IF)	Proteintech, Planegg-Martinsried	36411-1-AP
panKeratin (Keratin 5)	Kaninchen (pk)	1:2000	Proteintech, Planegg-Martinsried	36411-1-AP
pan-Ras OP40	Maus (mk)	1:500	Merck Millipore, Darmstadt	OP40
Paxillin	Maus (mk)	1:2000	Becton Dickinson, Heidelberg	610843
Paxillin	Maus (mk)	1:200 (IF)	Becton Dickinson, Heidelberg	610843
Phospho-Akt (XP) (Ser473)	Kaninchen (pk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9271
Phospho-GSK3 α β (Ser21/9)	Kaninchen (pk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	9331
Phospho-p42/44 MAPK (pERK1/2) XP (Thr202/Tyr204)	Kaninchen (pk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	4370
Phospho-S6 (Ser235/Ser236)	Kaninchen (pk)	1:4000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2211
Phospho-VimentinSer38	Kaninchen (pk)	1:1000	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg	Sc16673
Phospho-VimentinSer83	Kaninchen (pk)	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	3878
S6 Ribosomal Protein (54D2)	Maus (mk)	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	2217
Vimentin	Maus (mk)	1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	V6630
Vimentin	Kaninchen (pk)	1:4000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	5741
Vimentin	Maus (mk)	1:500 (IF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	V6630
Vinkulin	Maus (mk)	1:400 (IF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	V9131

α -Tubulin	Maus (mk)	1:4000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T-5168
β -Aktin	Maus (mk)	1:5000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A-5441
β -Catenin	Kaninchen (pk)	1:5000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C-2206
β -Catenin	Kaninchen (pk)	1:500 (IF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	C-2206

2.1.13 Sekundäre Antikörper für Immunoblotting und Immunfluoreszenz

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper aufgelistet.

Tabelle 11: Übersicht der sekundären Antikörper für das Immunoblot- und Immunfluoreszenz-Verfahren. vorverd.= vorverdünnt.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
IRDye® 680LT anti-Mouse IgG (H + L)	Ziege	1:30.000 (1:10 vorverd.)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	926-68021
IRDye® 800CW anti-Rabbit-IgG (H + L)	Ziege	1:15.000 (1:10 vorverd.)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	926-32211
Anti-Maus IgG-Peroxidase	Ziege	1:5000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	A-4416
Anti-Kaninchen IgG, Alexa488	Ziege	1:2000	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	A-11008
Anti-Maus IgG, Cy3	Ziege	1:2000	Dianova, Hamburg	115-165-003
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	-	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-9564

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivieren der Zellen

Die Arbeit unter einer Sicherheitswerkbank, die vor Beginn der Zellkulturarbeit mit 70 %igem Alkohol desinfiziert wurde, sollte die Sterilität während der Zellkulturarbeiten sicherstellen. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 9 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte im Kulturmedium (siehe Tabelle 7) kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Vor Verwendung wurde das Kulturmedium mit dem Steritop Filter steril filtriert und wie das CMF-PBS im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt. Trypsin-EDTA wurde bei Raumtemperatur erwärmt. Diese Medien wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Wie in Tabelle 12 dargestellt, wurden je nach Schalengröße verschiedene Mengen des Kulturmediums verwendet:

Tabelle 12: Volumina des Kulturmediums.

Zellkulturschale	Kulturmedium	Wachstumsfläche
10 cm-Schale	9 mL	9,5 cm ²
6 cm-Schale	3 mL	58 cm ²
6-Well	2 mL pro Well	21 cm ²

2.2.2 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen einer 80-90 %igen Konfluenz wurden die Zellen auf andere Zellkulturschalen verteilt. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und verbliebene Reste mit 5 mL 1x CMF-PBS abgewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 37 °C mit 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, um die Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte zu lösen. Dieser Prozess wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Durch Hinzugabe von 5 mL Kulturmedium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Polypropylenröhrchen überführt, worauf eine Zentrifugation für 3 min mit 1000 rpm (200 x g) bei RT folgte. Anschließend wurde das Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Konfluenz auf die Zellkulturschalen verteilt. Kreuzförmiges Schwenken der Zellkulturschale diente der gleichmäßigen Verteilung der Zellen auf dem Schalenboden.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Um die gewünschte Konfluenz zu erreichen, wurde die Zellzahl einer Resuspension bestimmt, sodass die Zellen entsprechend ausgesät werden konnten. Hierfür wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben bis zur Zentrifugation vorgegangen. Die Resuspension des Zellsediments erfolgte zur Bestimmung der Zellzahl immer in 10 mL Kulturmedium, wovon 10 µL auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen wurden und deren 4 Quadranten ausgezählt wurden. Ein Quadrant entspricht dabei der Fläche von 1 mm² und einem Volumen von 1 mm³. Der errechnete Mittelwert wurde mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension zu ermitteln. Die Zellen wurden entsprechend der gewünschten Konfluenz auf die Zellkulturschalen pipettiert.

2.2.4 Herstellung von Proteinlysaten

Um die Menge und Verteilung zellulärer Proteine zu analysieren, wurden Proteinlysate hergestellt. Hierfür wurden alle verwendeten Reaktionsgefäße und Puffer auf 4 °C vorgekühlt und die Zellen und Lysate durchgehend auf Eis aufbewahrt, um der Degradation von Proteinen durch Proteasen entgegenzuwirken. Zur Vorbereitung wurde außerdem 2x RIPA-Puffer vor Gebrauch 1:1 mit Milli-Q-H₂O, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren verdünnt. Die Zugabe der Protease- und Phosphatase-Inhibitoren sollte durch Inhibition der in den Zellen vorhandenen Proteasen und Phosphatasen dem Abbau von Proteinen und deren Dephosphorylierung entgegenwirken. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und restliches Medium mit 2 mL vorgekühltem 1x TBS abgewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 1 x RIPA-Lysepuffer lysiert. Das Volumen des Lysepuffers variierte je nach Zelllinie und Konfluenz. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Schalenboden abgeschabt

und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Homogenisierung erfolgte bis zu einem Volumen von 150 µL Lysepuffer im Ultraschallbad. Ab einem Volumen von 150 µL Lysepuffer wurden die Lysate mithilfe einer 26 G-Kanüle und Tuberkulinspritze homogenisiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min mit 13.000 rpm (16.100 x g). Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Lysate für einige Minuten in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.5 Tritonfraktionierung

Zur genaueren Darstellung der Lokalisation von Proteinen in den Zellen können mithilfe der Tritonfraktionierung Proteine, die am Zytoskelett verankert sind, von nicht verankerten oder nicht in Zellorganellen gebundenen Proteinen getrennt werden. Nach Inkubation der Zellen mit Triton X-100, welches Zellmembranen auflöst, wird das Lysat durch Zentrifugation in eine tritonlösliche und eine tritonunlösliche Fraktion getrennt. Die tritonlösliche Fraktion enthält dabei die nicht am Zytoskelett verankerten Proteine. Die tritonunlösliche Fraktion hingegen enthält die am Zytoskelett bzw. an Zellorganellen gebundenen Proteine.

Für die Tritonfraktionierung wurden die entsprechenden Lösungen, Puffer und Reaktionsgefäße auf 4 °C vorgekühlt verwendet und die Zellen und Lysate bis zum Einfrieren durchgehend auf Eis aufbewahrt. Zunächst wurde restliches Medium mit 2 mL 1x TBS + 1 mM CaCl₂ abgewaschen. Das CaCl₂ stabilisiert hierbei Cadherine. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 4 °C mit 1 x Tritonpuffer auf dem Wippschüttler inkubiert, mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.400 rpm (16.100 x g) für 10 min. Der Überstand enthält nun die tritonlösliche Fraktion, welche separat eingefroren wurde. Das Zellsediment wurde in RIPA-Puffer aufgelöst und im Ultraschallbad für 5 min homogenisiert. Das Volumen des RIPA-Puffers entsprach der Hälfte des Volumens des Tritonpuffers. Auch für die Tritonfraktionierung wurde 2 x RIPA-Puffer vor Gebrauch 1:1 mit Milli-Q-H₂O, Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitoren verdünnt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.400 rpm (16.100 x g) für 10 min bei 4 °C. Der Überstand enthält die tritonunlösliche Fraktion. Die Lysate wurden zur langfristigen Lagerung zunächst einige Minuten in flüssigem Stickstoff, anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.6 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Zur Bestimmung des Proteingehalts eines Zelllysats wurde der *Bicinchoninic Acid Protein Assay* durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von zweiwertigen

Kupferionen zu einwertigen Kupferionen bei der Bindung an Peptide ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$). Bicinchoninsäure bildet dann mit den einwertigen Kupferionen einen Komplex, durch den ein Farbumschlag von grün zu violett ausgelöst wird (102). Die Absorption wird photometrisch bei 562 nm gemessen. Da der Zusammenhang von Proteingehalt und Färbung in einem bestimmten Konzentrationsbereich nahezu linear ist, kann aus der gemessenen Absorption auf den Proteingehalt geschlossen werden.

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde zunächst die Eichgerade in einer 96-Well-Platte pipettiert (siehe Tabelle 13), die als Grundlage für die Bestimmung des Proteingehalts der Proben diente. Anschließend wurden die Proben 1:10 in Milli-Q-H₂O verdünnt (45 µL H₂O + 5 µL Lysat) und 20 µL als Doppelwerte aufgetragen. Mit Zugabe von 180 µL des BCA-Färbereagenz wurde die Reaktion gestartet. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die Messung am *ELx800 Absorbance Microplate Reader* (Biotek). Anhand der ermittelten Extinktionswerte wurden die Proteinkonzentrationen der Probe errechnet. In der vorliegenden Arbeit wurde immer nach der Herstellung der Proteinlysate der *Bicinchoninic Acid Protein Assay* durchgeführt.

Tabelle 13: Pipettierschema der Eichgerade des *Bicinchoninic Acid Protein Assay*.

	1	2	3	4	5	6	7
A	20 µL H ₂ O	18 µL H ₂ O +2 µL BSA	16 µL H ₂ O +4 µL BSA	14 µL H ₂ O +6 µL BSA	12 µL H ₂ O +8 µL BSA	10 µL H ₂ O +10 µL BSA	7,5 µL H ₂ O +12,5 µL BSA
B	20 µL H ₂ O	18 µL H ₂ O +2 µL BSA	16 µL H ₂ O +4 µL BSA	14 µL H ₂ O +6 µL BSA	12 µL H ₂ O +8 µL BSA	10 µL H ₂ O +10 µL BSA	7,5 µL H ₂ O +12,5 µL BSA

2.2.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können die in den Lysaten enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht ungeachtet ihrer molekularen Ladung oder ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur aufgetrennt werden. Das Polyacrylamidgel besteht aus jeweils einem Sammel- und einem Trenngel, die sich in der Konzentration ihrer Ionen, ihres pH-Werts und ihrer Porengröße unterscheiden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE (Ansatz für je 2 Gele).

	Trenngel 8,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel
Milli-Q	3,6 mL	3,2 mL	2,45 mL	1,3 mL
3 M Tris pH 8,8	1 mL	1 mL	1 mL	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,38 mL
30 % Acrylamid	2,3 mL	2,6 mL	3,25 mL	0,38 mL
2 % Bisacrylamid	0,9 mL	1 mL	1,2 mL	0,15 mL
10 % SDS	0,08 mL	0,08 mL	0,08 mL	0,03 mL
60 % Saccharose	-	-	-	0,75 mL
TEMED	8 µL	8 µL	8 µL	4 µL
10 % APS	50 µL	50 µL	50 µL	40 µL
Trennbereich	150 kDa-50 kDa	130 kDa-30 kDa	120 kDa-20 kDa	

Um eine gleichmäßige Aushärtung und eine gerade Trennschicht zu erreichen, wurden die nach Tabelle 14 pipettierten Trenngele mit H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Zur vollständigen Aushärtung wurden die Trenngele über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Sammelgele wurden vor dem Beladen der Gele gegossen und polymerisierten 20 min bei RT. Das Einspannen der Gele in eine mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllte Gelelektrophoresekammer verhinderte deren Austrocknen.

Die Proteinlysate wurden mindestens 1:5 mit 5 x SDS-Probenpuffer verdünnt. Es folgte das Aufkochen dieser Proben bei 95 °C für 8 min und eine Abzentrifugation bei 4 °C für ca. 20 s. Durch das Erhitzen und die Komponenten des SDS-Probenpuffers liegen die Proteine nun in ihrer Primärstruktur vor. Das im Probenpuffer enthaltene DTT löst die Disulfidbrückenbindungen und das negativ geladene SDS maskiert die Ladungen der Aminosäuren, wodurch die Proteine einheitlich negativ geladen vorliegen. Es wurden entweder 30 µg oder 50 µg der Proteinlysate aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 80-120 V an die Gelelektrophoresekammer wurden die Proteine im Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt.

2.2.8 Immunoblotting

Beim Immunoblotting werden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, auf der sie durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Hierfür wurde das SDS-Gel auf die Membran gelegt und luftblasenfrei zwischen Whatman-Chromatographie-Papier und Schwammtüchern in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingespannt. An diesem sog. Tankblot wurde eine Spannung angelegt, wodurch die Proteine auf die Nitrocellulosemembran

transferierten. Es wurde je nach Acrylamidgehalt und Größe der Proteine bei 70 V für 1 h bei RT, bei 60 V für 3 h bei 4 °C oder bei 20 V für 10 h bei 4 °C geblottet.

2.2.8.1 Ponceaurot-Färbung

Im Anschluss an den Immunoblot wurden mittels Milli-Q-H₂O Reste des Transferpuffers von der Nitrocellulosemembran abgewaschen. Diese wurde anschließend für 4 min in Ponceau-S-Lösung gefärbt, in Milli-Q-H₂O gewaschen und die gefärbte Membran am Scanner erfasst. Abschließend wurde die Nitrocellulosemembran in 1 x TBS entfärbt und 1 h bei RT auf dem Wippschüttler mit 5 % Milchpulverlösung in TBS geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde überschüssiges Milchpulver mit 1 x TBS abgewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Wippschüttler.

2.2.8.2 Immunfärbung der Nitrocellulosemembran

Um die Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachzuweisen, wurde die Membran mit dem primären Antikörper, gelöst in 3 % BSA in TBS-T, bei 4 °C über Nacht auf dem Wippschüttler inkubiert. Der primäre Antikörper ist spezifisch für das Zielprotein. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in 1x TBS, für 1 h bei RT im Dunklen. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper und war entweder mit *horseradish peroxidase* (HRP) oder mit einem Fluorochrom (IRDye) gekoppelt. Nach der Inkubation mit den primären und den sekundären Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran jeweils zweimal mit 1 x TBS-T und einmal mit 1x TBS für jeweils 5 min gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf dem Wippschüttler.

2.2.8.3 Detektion der Proteine mittels Nah-Infrarot-Lumineszenz

An Fluoreszenzfarbstoffe (IRDye) gekoppelte Sekundärantikörper wurden im Odyssey SA- oder Odyssey CLx-System (LI-COR Biosciences) nachgewiesen. Mittels Infrarotlicht wurden die Fluoreszenzfarbstoffe bei 685 nm bzw. 785 nm angeregt und das emittierte Licht detektiert (74). Aus der Intensität des detektierten Lichts kann quantitativ auf die Proteinmenge geschlossen werden.

2.2.8.4 Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz

HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurden im Fusion SL4-3500 WL-System (Vilber Lourmat) detektiert. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wodurch Licht emittiert wird. Das SuperSignal™ West Pico Plus Chemiluminescent Substrate, eine 1:1 Lösung

aus Luminol (*Enhancer Solution*) und stabiler Peroxidase (*stabile peroxide solution*) verstärkt diese Emission. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Nitrocellulosemembran im Dunklen in dieser Lösung mit anschließender Detektion der emittierten Lichtquanten über einen unterschiedlichen Zeitraum bei der Sensitivitätsstufe *full resolution* oder *high sensitivity*.

2.2.9 Immunfluoreszenzverfahren

Für den Nachweis der zellulären Zytoskelettelemente wurde die Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierfür wurden die auf Deckglässchen kultivierten Zellen mit 1x CMF-PBS gewaschen und anschließend in 4 % Paraformaldehyd in 1 x CMF-PBS für 10 min für den Nachweis von Aktin, Vinkulin, Palladin, Vimentin und Keratin oder in einem -20 °C kaltem 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol für 10 min für den Nachweis von β -Catenin und Paxillin fixiert. Anschließend wurden die Deckglässchen zweimal mit 1 x CMF-PBS gewaschen. Bei einer Fixierung mit Paraformaldehyd wurde die Zellwand mit 0,1 % Triton X-100 in 1 x CMF-PBS für 10 min bei RT durchgängig gemacht. Bei einer Fixierung mit Methanol/Aceton entfällt dieser Schritt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Deckglässchen mit 3 % BSA in 1 x CMF-PBS für 1 h inkubiert. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 x CMF-PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit den primären Antikörpern, verdünnt in 0,2 % BSA in 1 x CMF-PBS, für 2 x 30 min inkubiert, wobei 30 μ L der Antikörperlösung pro Deckglas (Durchmesser: 1,2-1,5 cm) verwendet wurden. Die primären Antikörper richten sich spezifisch gegen das nachzuweisende Protein. Ab diesem Schritt wurden die Deckglässchen in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden nicht gebundene primäre Antikörper einmal mit 0,02 % Tween® 20 in 1 x CMF-PBS und zweimal mit 1 x CMF-PBS abgewaschen. Die Zellen wurden mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in 0,3 % BSA in 1 x CMF-PBS für ebenfalls 2 x 30 min inkubiert. Auch hier wurden 30 μ L der Antikörperlösung pro Deckglas verwendet. Da die Sekundär-Antikörper mit Fluorochromen gekoppelt sind, wurde ab diesem Schritt ohne Kunstlicht gearbeitet, um eine Abschwächung des Signals zu verhindern. Die Sekundär-Antikörper waren entweder an Cy3 oder Alexa488 gekoppelt und richten sich gegen den Primär-Antikörper. Zum Nachweis der Aktinfilamente wurde das an Alexa488 gekoppelte Phalloidin (Toxin des Knollenblätterpilzes) verwendet. Phalloidin stabilisiert das F-Aktin und verhindert so den Abbau der Aktinfilamente (81). Bei der Färbung mit Phalloidin-Alexa488 entfällt die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Alle Färbungen wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 (Olympus) kontrolliert. Bei gelungener Färbung folgte die Kernfärbung. Hierfür wurden die Zellen mit 1:100 in 1 x CMF-PBS

verdünntem DAPI (10 µg/mL) für 30 min im Dunklen inkubiert. Die Deckglässchen wurden nach dem Waschen in Milli-Q-H₂O auf Objektträgern mithilfe eines Tropfens Elvanol fixiert. Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Zur Dokumentation wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 Aufnahmen angefertigt.

2.2.10 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Genexpression in den behandelten Zellen wurde mittels quantitativer *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion analysiert. Hierfür wurde nach Herstellerangaben mithilfe des *RNeasy® Mini Kits* (Qiagen) aus konfluent gewachsenen Zellen RNA isoliert. Die Konzentration dieser RNA wurde am Nanodrop 1000 Spectrophotometer bestimmt und ein Aliquot der RNA wurde anschließend zur Überprüfung der Qualität in einem Agarosegel aufgetrennt. Für die reverse Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA), wurde 1 µg der RNA mit Oligo-dT Primern und der *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) nach dem *First Strand cDNA Synthesis Protocol* (New England BioLabs) umgeschrieben. Die Verarbeitung der Proben wurde bis zu diesem Schritt von Mitarbeitern der AG von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl durchgeführt. Zur genauen Durchführung wird auf die Doktorarbeit von Frau Dr. Julia Seiz (111) verwiesen.

Der qRT-PCR-Reaktionsansatz wurde unter sterilen Bedingungen pipettiert. Hierfür wurden pro Probe 10 µL *Quantinova SYBR Green Mastermix* (Qiagen), 8 µL Nuklease freies, steriles H₂O, 1 µL *RPLP0* bzw. 1 µL *Vimentin-forward-* und *-reversed-*Primer-Mix (10 pmol/µl) in der 96-Well PCR-Platte vorgelegt. Es wurden immer Doppelwerte pipettiert. Das Haushaltsgen *RPLP0* diente als Kontrolle. Nach Hinzugabe von 1 µL der entsprechenden cDNA wurde die 96-Well PCR-Platte mit dem *Heat Sealer S100* (Eppendorf) versiegelt, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern. Die Amplifikation erfolgte im *Stratagene Mx3005P real time PCR cycler* (Agilent Technologies) mit der qPCR Software MxPro Version 4.1 (Agilent Technologies) anhand des folgenden Amplifikationsprogramms:

Tabelle 15: Darstellung des verwendeten Amplifikationsprogramms für die RT-qPCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 min	1
Amplifikation	95 °C	30 s	40
	60 °C	1 min	
	72 °C	1 min	

2.2.10.1 Auswertung der qRT-PCR

Nach jedem Amplifikationszyklus wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Sobald ein festgelegter Schwellenwert erreicht wurde, wurde der Quantifizierungszykluswert (Cq) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ -Methode. Anhand nachfolgender Rechnung wurde der relative Expressionsunterschied des zu untersuchenden Gens berechnet:

$$\Delta Cq = Cq_{Vim} - Cq_{XS13RPLP0}$$

Cq_{Vim} = Quantifizierungszykluswert des Vimentin-Gens

$Cq_{XS13RPLP0}$ = Quantifizierungszykluswert des Kontrollgens

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_I - \Delta Cq_{DMSO}$$

Cq_I = Quantifizierungszykluswert der inhibierten Probe

Cq_{DMSO} = Quantifizierungszykluswert der Kontrollprobe

$$FC = 2^{(-\Delta\Delta Cq)}$$

FC = relativer Expressionsunterschied (*Fold Change*)

Zunächst wurden aus den jeweiligen Doppelwerten der Mittelwert gebildet. Der mittlere Cq-Wert des Referenzgens (*RPLP0*) wurde vom mittleren Cq-Wert des Vimentin-Gens subtrahiert (ΔCq). Die jeweiligen ΔCq -Werte wurden auf die Kontrollprobe bezogen, indem wiederum der Cq-Wert des Kontrollgens vom Cq-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde ($\Delta\Delta Cq$). Um den relativen Expressionsunterschied zu berechnen, wurde $-\Delta\Delta Cq$ zur Basis 2 gesetzt (FC), da die Referenzproben auf den Wert 1 gesetzt wurden ($2^0 = 1$) (100).

2.2.11 Densitometrische Auswertung

Mithilfe der Software ImageStudio Light Version 5.2 von LI-COR Biosciences wurden die Intensitäten der jeweiligen Proteinbande im Immunoblot gemessen. In Microsoft Excel 2021 (Microsoft) wurden die Werte auf ihre Beladungskontrolle bzw. bei Nachweis der Phosphorylierung auf die Proteingesamtmenge normiert und auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Berechnung des jeweiligen Mittelwerts und der Standardabweichung erfolgte in Microsoft Excel 2021 und GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software Inc). Bei allen Immunoblots wurde eine densitometrische Auswertung durchgeführt.

2.2.12 Messung der Zellfläche

Mithilfe der Software CellSens Dimension 1.6 (Olympus) wurde die Zellfläche anhand der Immunfluoreszenzbilder ausgemessen. Es wurden dafür die Immunfluoreszenzbilder von β -Catenin, K-Ras4B, Phalloidin, Keratin und Palladin verwendet. Die Daten wurden in Microsoft Excel 2021 weiterverarbeitet.

2.2.13 Quantifizierung Vinkulin- und Paxillin-haltiger Fokalkontakte

Die quantitative Analyse der Vinkulin- und Paxillin-haltigen Fokalkontakte erfolgte mithilfe der *Open Source*-Software Fiji (Fiji Is Just ImageJ) 1.54p (NIH, USA) (110). Zunächst wurde ein Ausschnitt in der jeweiligen Immunfluoreszenzaufnahme markiert, welcher komplett abgebildete Zellen beinhaltete. Der Hintergrund wurde durch die Anwendung „Substract Background“ der Kontrast mittels „Brightness/Contrast“ angepasst. Nach Setzen der Funktion „Threshold“ erfolgte die Analyse der Fokalkontakte mittels „Analyze Particles“. Zur Vereinfachung erfolgte die Erstellung eines Makros, welches im Anhang (siehe Kapitel 9.3) zu finden ist. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte in Microsoft Excel 2021.

2.2.14 Statistische Formeln

Folgende Formeln wurde zur Berechnung des Mittelwertes (\bar{x}) und der Standardabweichung (SD) verwendet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$SD = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i = Einzelwert; n = Anzahl der durchgeführten Versuche

2.2.15 Erstellen der Abbildungen

Die in der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Abbildungen wurden mit der Software GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) oder mit Microsoft PowerPoint 2021 (Microsoft, München) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf Signaltransduktionsmoleküle in HCC-44- und H23-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Reagibilität von K-Ras G12C-mutierten Zellen auf die K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 aufgezeigt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege durch MRTX849 und AMG510 in Zellen der NSCLC-Zelllinien H23 und HCC-44 unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Diese Zellen weisen die K-Ras-Mutation G12C auf, hierbei ist die Zelllinie H23 heterozygot (G12C/WT) und die Zelllinie HCC-44 homozygot (G12C/G12C) mutiert (85). In diesen Zellen wurde in einer Versuchsreihe die Aktivierbarkeit Ras-abhängiger Signaltransduktionsmoleküle durch Wachstumsfaktoren und der Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf diese Signaltransduktionsmoleküle untersucht. Versuche dieser Versuchsreihe wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem n=1 bzw. n=2 durchgeführt, da in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl weitere Versuche mit gleichem oder ähnlichem Versuchsaufbau mit HCC-44- und H23-Zellen, aber auch mit Zellen weiterer Zelllinien, darunter die Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2, durchgeführt wurden.

3.1.1 Nachweis der Aktivierbarkeit von ERK1/2 und Akt durch FCS in HCC-44- und H23-Zellen

In der ersten Versuchsreihe wurde die Aktivität und Aktivierbarkeit von Ras-abhängigen Signalwegen durch FCS anhand der Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK1/2) und Akt (pAkt) im Immunoblot untersucht. Hierfür wurden in Kulturmedium konfluent gewachsene HCC-44- und H23-Zellen für 16 h in DMEM ohne Zusätze inkubiert und anschließend für 2, 5, 10, 15 und 30 min in Kulturmedium mit 10 % FCS inkubiert. Als Kontrolle wurden konfluent gewachsene Zellen verwendet, welche für 16 h in DMEM inkubiert wurden. Die Zellen wurden in 1 x RIPA-Puffer lysiert und die Proteine in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Immunoblotting im Odyssey SA- oder Odyssey CLx-System. In Abb. 6 sind repräsentative Immunoblots abgebildet. Für den Nachweis der Aktivierung wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt mittels phospho-spezifischer Antikörper detektiert. Der Nachweis der Menge von ERK1/2 und Akt diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge und der Nachweis von GAPDH als zusätzliche Beladungskontrolle. Die Signalintensität der Banden wurde densitometrisch analysiert, wobei aus dem Verhältnis von phosphoryliertem Protein zur Gesamtmenge des Proteins die relative Phosphorylierung gebildet wurde. Als Referenzwert, welcher auf 1 gesetzt wurde, diente die relative Phosphorylierung der unbehandelten DMEM-Kontrolle.

Angegeben sind die mittlere Veränderung der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt aus den zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen und in Klammern die Einzelwerte der densitometrischen Analyse.

In den HCC-44- (Abb. 6 A) und H23-Zellen (Abb. 6 B) wurde jeweils ein gradueller Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt in den FCS-inkubierten Zellen detektiert. Für die HCC-44-Zellen wurde somit die größte Zunahme von pERK1/2, im Mittel auf das 10,31-fache (5,44; 15,17; n=2) und von pAkt, im Mittel auf das 26,34-fache (16,56; 36,12; n=2) der DMEM-Kontrolle bei 30 min gemessen. Nach Inkubation der H23-Zellen mit FCS für 30 min zeigte sich ein Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 im Mittel auf das 3,30-fache (4,06; 2,53; n=2) und von pAkt auf das 58,32-fache (41,00; 75,65; n=2) der DMEM-Kontrolle, was der höchsten Phosphorylierung entsprach. Zusammengefasst zeigen die aufgeführten Ergebnisse eine Aktivierung von ERK1/2 und Akt in HCC-44- und H23-Zellen durch in FCS enthaltene Wachstumsfaktoren.

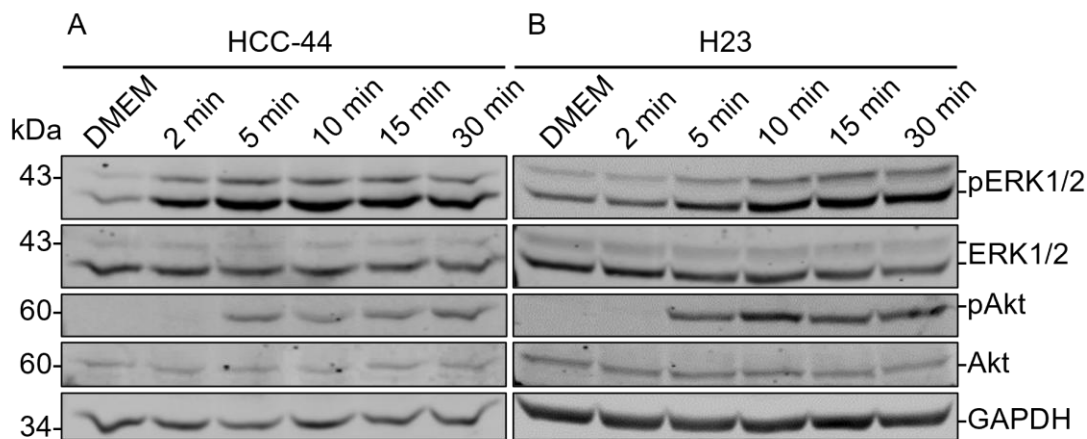


Abb. 6 A, B: Anstieg der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in HCC-44- (A) und H23-Zellen (B) durch in FCS-enthaltene Wachstumsfaktoren. HCC-44 und H23-Zellen wurde für 16 h in DMEM ohne Zusätze inkubiert. Vor der Zellyse mit RIPA-Lysepuffer erfolgte die Zugabe von 10 % FCS für den jeweiligen Zeitraum. Als Kontrolle dienten in DMEM inkubierte Zellen. Pro Spur wurden 30 µg (A) bzw. 50 µg (B) Proteinlysate elektrophoretisch in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunoblotting im Odyssey SA- bzw. CLx-System. Für die Detektion von pERK1/2, ERK1/2, pAkt, Akt und GAPDH wurden spezifische Antikörper verwendet. Für den Nachweis der eingesetzten Proteinmenge wurden ERK1/2 und Akt und als zusätzliche Beladungskontrolle GAPDH detektiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Immunoblots (n=2).

3.1.2 Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf intrazelluläre Signalwege

Nach der Analyse der Aktivierbarkeit der Signaltransduktionsmoleküle durch FCS, folgte die Analyse der Aktivität und Induzierbarkeit der Signalmoleküle Akt und ERK1/2, sowie der Akt-Effektoren GSK3α/β und ribosomales Protein S6 durch den Wachstumsfaktor EGF. Zusätzlich wurden die HCC-44- und H23-Zellen mit den K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 inkubiert, um auch deren Einfluss auf die Aktivität der

Signaltransduktionsmoleküle zu untersuchen. Durch die nachfolgende Stimulation der Zellen mit EGF sollte die inhibitorische Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren verdeutlicht werden.

Hierfür wurden konfluent gewachsene HCC-44- und H23-Zellen zunächst für 2 h in Kulturmedium mit dem K-Ras G12C-Inhibitor AMG510 inkubiert und 15 min vor der Zelllyse mit 30 ng/mL EGF in Kulturmedium stimuliert. In einem weiteren Versuch wurden konfluent gewachsene HCC-44- und H23-Zellen für 24 h in serumfreiem Medium mit den K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 inkubiert und ebenfalls 15 min vor der Zelllyse mit 30 ng/mL EGF in serumfreiem Medium stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen für 24 h und 48 h in Kulturmedium mit MRTX849 und AMG510 inkubiert. Eine Stimulation erfolgte bei diesem Ansatz nicht, um die basale Aktivität der Proteine zu bestimmen. Zuletzt wurden die Auswirkungen der Behandlung mit MRTX849 und AMG510 in serumfreiem Medium mit den Auswirkungen der Inkubation in Kulturmedium verglichen. Als Kontrolle wurden Zellen in diesen Versuchen mit DMSO, welches das Lösungsmittel der K-Ras G12C-Inhibitoren ist, bzw. mit DMSO+EGF behandelt.

Alle Lysate wurden mit 1 x RIPA-Lysepuffer hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate erfolgte jeweils in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden anschließend mittels Immunoblotting im Odyssey SA- bzw. Odyssey CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System detektiert. In dieser Versuchsreihe wurde für den Nachweis der Aktivierung die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, S6 (pS6) und GSK3 α/β (pGSK3 α/β) mittels phospho-Protein-spezifischer Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge wurde die Gesamtmenge von Akt, S6, GSK3 α/β und ERK1/2 nachgewiesen. Der Nachweis von GAPDH bzw. α -Tubulin diente als zusätzliche Beladungskontrolle. Zur Quantifizierung der Aktivität wurde die Signalintensität der Banden densitometrisch ausgewertet und die relative Phosphorylierung aus dem Verhältnis von phosphoryliertem Protein zur Gesamtmenge des Proteins gebildet. Es folgte der Bezug auf den Referenzwert, welcher auf 1 gesetzt wurde. Als Referenzwert diente in dieser Versuchsreihe die relative Phosphorylierung der DMSO- bzw. DMSO+EGF-behandelten Zellen. In Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2 wird zusätzlich das Verhältnis der relativen Phosphorylierung der EGF-stimulierten Zellen zur relativen Phosphorylierung der unstimulierten Zellen untersucht. In den folgenden Kapiteln (Kapitel 3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.2.3 und 3.1.2.4) sind die Einzelwerte der densitometrischen Auswertung bei n=1 aufgeführt. Bei der Analyse des Verhältnisses der relativen Phosphorylierung der EGF-stimulierten DMSO-Zellen zu den unstimulierten DMSO-Zellen ist zusätzlich die mittlere Veränderung bei n=2 angegeben. Da Vergleichsdaten in der Arbeitsgruppe vorlagen, wurden diese Versuche einmalig durchgeführt.

3.1.2.1 Hemmung der Aktivierbarkeit von Akt, GSK3 α/β , ERK1/2 und S6 durch AMG510 in der Kurzinkubation

Um den Einfluss von AMG510 auf intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, wurden H23- und HCC-44-Zellen in Kulturmedium für 2 h mit 10 nM, 100 nM und 250 nM AMG510 inkubiert und 15 min vor der Zellyse mit 30 ng/mL EGF in Kulturmedium stimuliert. DMSO bzw. DMSO+EGF-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. Durch die Stimulation der Zellen sollte die inhibitorische Wirkung des K-Ras G12C-Inhibitors AMG510 verstärkt dargestellt werden. Dieser Versuch wurde nur einmalig durchgeführt, da Vergleichsdaten in der Arbeitsgruppe vorlagen. Die Ergebnisse für die HCC-44- und H23-Zellen sind in Abb. 7 dargestellt. In Klammern sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben angegeben.

In den HCC-44-Zellen (Abb. 7 A) wurde im Vergleich zu den DMSO-Kontrollzellen die höchste Abnahme der basalen Phosphorylierung von Akt (0,27-fach) und S6 (0,40-fach) bei 100 nM AMG510 und die höchste Abnahme der basalen Phosphorylierung von GSK3 α (0,36-fach) bei 250 nM AMG510 detektiert. Nach Präinkubation mit 250 nM AMG510 wurde in HCC-44-Zellen ebenfalls eine Abnahme der EGF-induzierten Phosphorylierung von Akt (0,28-fach) und GSK3 α (0,48-fach), jedoch nicht von S6 (1,03-fach) im Vergleich zur EGF-stimulierten DMSO-Kontrolle gemessen. Die EGF-Stimulation der DMSO-behandelten Zellen führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Akt (4,70-fach), S6 (2,30-fach) und GSK3 α (2,60-fach) verglichen mit den unstimulierten DMSO-Zellen.

Die densitometrische Analyse zeigte für die H23-Zellen (Abb. 7 B) ebenfalls die höchste Abnahme der basalen Phosphorylierung von Akt (0,29-fach), GSK3 α (0,28-fach) und ERK1/2 (0,26-fach) bei 250 nM AMG510 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Nach Stimulation mit EGF zeigte sich in den mit 250 nM AMG510 präinkubierten H23-Zellen eine Abnahme des Gehalts von pAkt (0,49-fach), pGSK3 α (0,23-fach) und pERK1/2 (0,25-fach) im Vergleich zur DMSO+EGF-Kontrolle. Veränderungen der Phosphorylierung von S6 wurden nach AMG510- bzw. AMG510+EGF-Behandlung im Vergleich zur DMSO- bzw. DMSO+EGF-Kontrolle nicht gemessen. Die EGF-Stimulation der DMSO-inkubierten H23-Zellen führte zu einer höheren Phosphorylierung von GSK3 α (2,10-fach) und ERK1/2 (2,50-fach), nicht aber von Akt (1,04-fach) und S6 (0,76-fach) verglichen mit den unstimulierten DMSO-Zellen.

Aufgrund einer zu geringen Signalintensität von pGSK3 β konnte für die HCC-44- und H23-Zellen für diese GSK3-Isoform keine quantitative Analyse erfolgen.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die abgebildeten Daten, dass eine zweistündige AMG510-Behandlung zur Abnahme der basalen und EGF-induzierten Phosphorylierung von Akt und GSK3 α in HCC-44- und H23-Zellen führt. Des Weiteren wurde

nachgewiesen, dass die EGF-Stimulation zu einer Induktion der Aktivität von GSK3 α in beiden Zelllinien und zur Induktion der Akt-Aktivität in HCC-44-Zellen führt. Der Nachweis von ERK1/2 in H23-Zellen ergab ebenfalls eine Aktivierbarkeit durch EGF sowie eine Abnahme der basalen und EGF-induzierten Phosphorylierung durch AMG510.

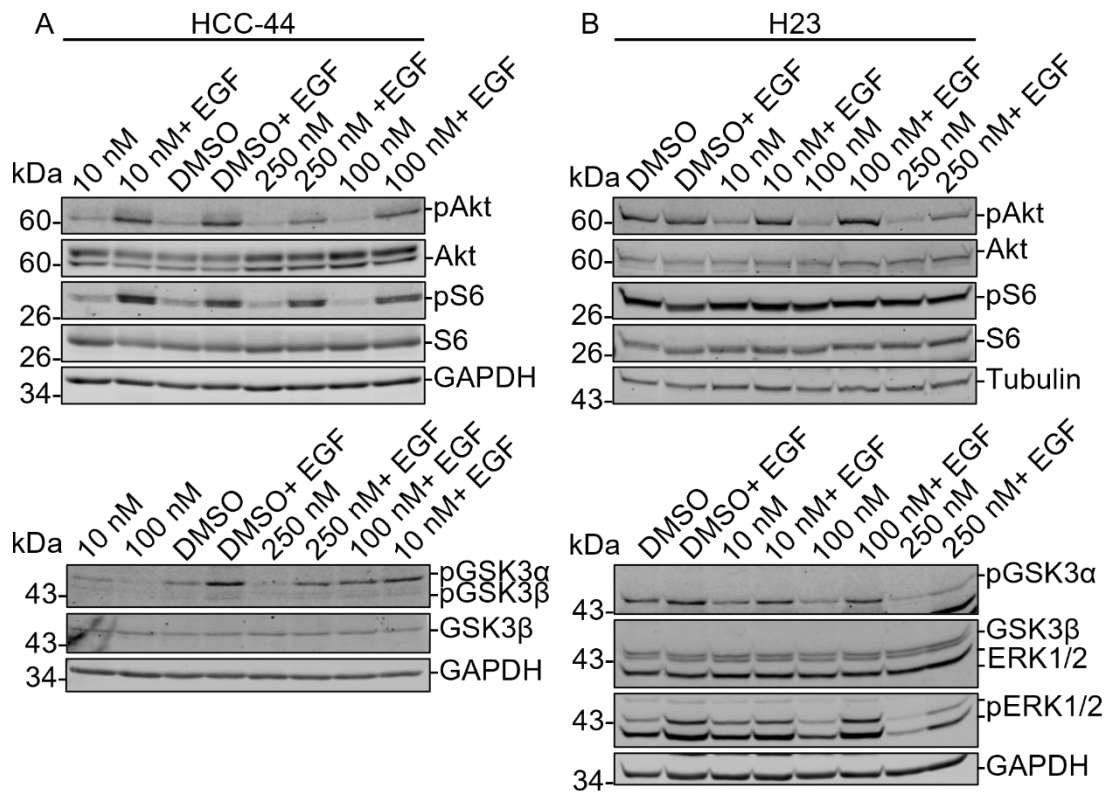


Abb. 7 A, B: Einfluss der zweistündigen AMG510-Behandlung auf die Aktivierbarkeit von Akt, S6 und GSK3 α/β in HCC-44-Zellen (A) und H23-Zellen (B). Die Zellen wurden für 2 h mit AMG510 in Kulturmedium inkubiert und 15 min vor der Zelllyse mit 30 ng/mL EGF in Kulturmedium stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit DMSO bzw. DMSO+EGF inkubiert. Pro Spur wurden 50 μ g Proteinlysate elektrophoretisch in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine im Immunoblotverfahren im Odyssey SA- bzw. CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System detektiert. Hierfür wurden Protein- und phospho-Protein-spezifische Antikörper verwendet. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge wurden Akt, S6, GSK3 β und zusätzlich GAPDH bzw. α -Tubulin detektiert (n=1).

3.1.2.2 Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf die Aktivierbarkeit von Akt, GSK3 α/β , ERK1/2 und S6 nach Serumentzug

Um den Einfluss von Serum auf die Signaltransduktion und die K-Ras G12C-Inhibition zu untersuchen, wurden HCC-44- und H23-Zellen durch Inkubation in serumfreiem Medium in einen unstimulierten Zustand versetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibition auf die Signaltransduktion wurde wiederum die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, S6 und GSK3 α/β im Immunoblotverfahren detektiert. Neben AMG510 wurde zudem MRTX849 als weiterer K-Ras G12C-Inhibitor verwendet. Da K-Ras G12C

auch in unstimulierten Zellen in der aktiven Form vorliegt, kann eine Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, S6 oder GSK3 α / β nach Behandlung der unstimulierten Zellen mit MRTX849 bzw. AMG510 auf die Inhibition von K-Ras G12C zurückgeführt werden.

Zellen der Zelllinien H23 und HCC-44 wurden in dieser Versuchsreihe für 24 h in serumfreiem Medium mit 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM und 50 nM MRTX849 bzw. AMG510 inkubiert. Die Stimulation mit 30 ng/mL EGF erfolgte 15 min vor der Zellyse in serumfreiem Medium, wodurch wiederum die inhibitorische Wirkung von MRTX849 und AMG510 deutlicher dargestellt werden sollte. Die Immunoblots mit den Proteinlysaten der HCC-44- bzw. H23-Zellen sind in Abb. 8 bzw. Abb. 9 abgebildet. Angegeben sind außerdem die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Die vollständigen Densitometrie-Ergebnisse des Verhältnisses der EGF-stimulierten zur unstimulierten Probe sind in Tabelle 16 im Anhang aufgeführt. Die Versuche dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls mit n=1 durchgeführt, da weitere Versuche in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl durchgeführt wurden.

Eine Abnahme der basalen Phosphorylierung wurde in den MRTX849-behandelten HCC-44-Zellen (Abb. 8) nur für ERK1/2 bei 50 nM MRTX849 (0,33-fach) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen. Hingegen nahm in den AMG510-inkubierten HCC-44-Zellen bereits bei 25 nM die basale Phosphorylierung von ERK1/2 (0,56-fach), Akt (0,36-fach) und S6 (0,40-fach) verglichen mit den DMSO-Kontrollzellen ab. Da der Serumentzug zu einem fast vollständigen Verlust der Phosphorylierung von GSK3 α / β führte, konnte hier keine verlässliche densitometrische Bestimmung erfolgen. Nach Zugabe von EGF ergab die densitometrische Phosphorylierungsanalyse in MRTX849-präinkubierten HCC-44-Zellen bei 50 nM im Vergleich zur DMSO+EGF-Kontrolle einen Anstieg der Phosphorylierung von Akt (2,31-fach), GSK3 α / β (1,76-fach) und S6 (1,86-fach), nicht aber von ERK1/2 (1,22-fach). In AMG510-präinkubierten HCC-44-Zellen konnte hingegen bei 25 nM eine Abnahme der EGF-induzierten Phosphorylierung von Akt (0,33-fach) und S6 (0,55-fach), nicht aber von ERK1/2 (0,94-fach) und GSK3 α / β (1,16-fach) im Vergleich zur DMSO+EGF-Kontrolle bestimmt werden.

Die Zugabe von EGF führte in den DMSO-behandelten HCC-44-Zellen zu einer Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 auf das 2,16-fache (2,05; 2,28; n=2), von Akt auf das 2,84-fache (1,62; 4,06; n=2), von GSK3 α / β auf das 4,03-fache (4,05; 4,02; n=2) und von S6 auf das 2,43-fache (1,87; 2,99; n=2) der unstimulierten DMSO-Probe. Das Verhältnis der EGF-stimulierten zur unstimulierten Probe stieg bei 50 nM MRTX849 in den HCC-44-Zellen für pERK1/2 auf das 3,68-fache, für pAkt auf das 2,68-fache und für pS6 auf das 2,05-fache verglichen mit dem jeweiligen Verhältnis der EGF-stimulierten zur unstimulierten DMSO-Probe. Bei 50 nM AMG510 war das Verhältnis der stimulierten

zur unstimulierten Probe für pERK1/2 auf das 2,41-fache, für pAkt auf das 1,25-fache und für pS6 auf das 1,36-fache des jeweiligen Verhältnisses der DMSO+EGF zur DMSO-Probe erhöht. Durch die verminderte basale Phosphorylierung nach MRTX849- und AMG510-Präinkubation kam es folglich in den HCC-44-Zellen zu einer stärkeren Phosphorylierung von ERK1/2 nach EGF-Stimulation als nach der Stimulation der DMSO-behandelten HCC-44-Zellen.

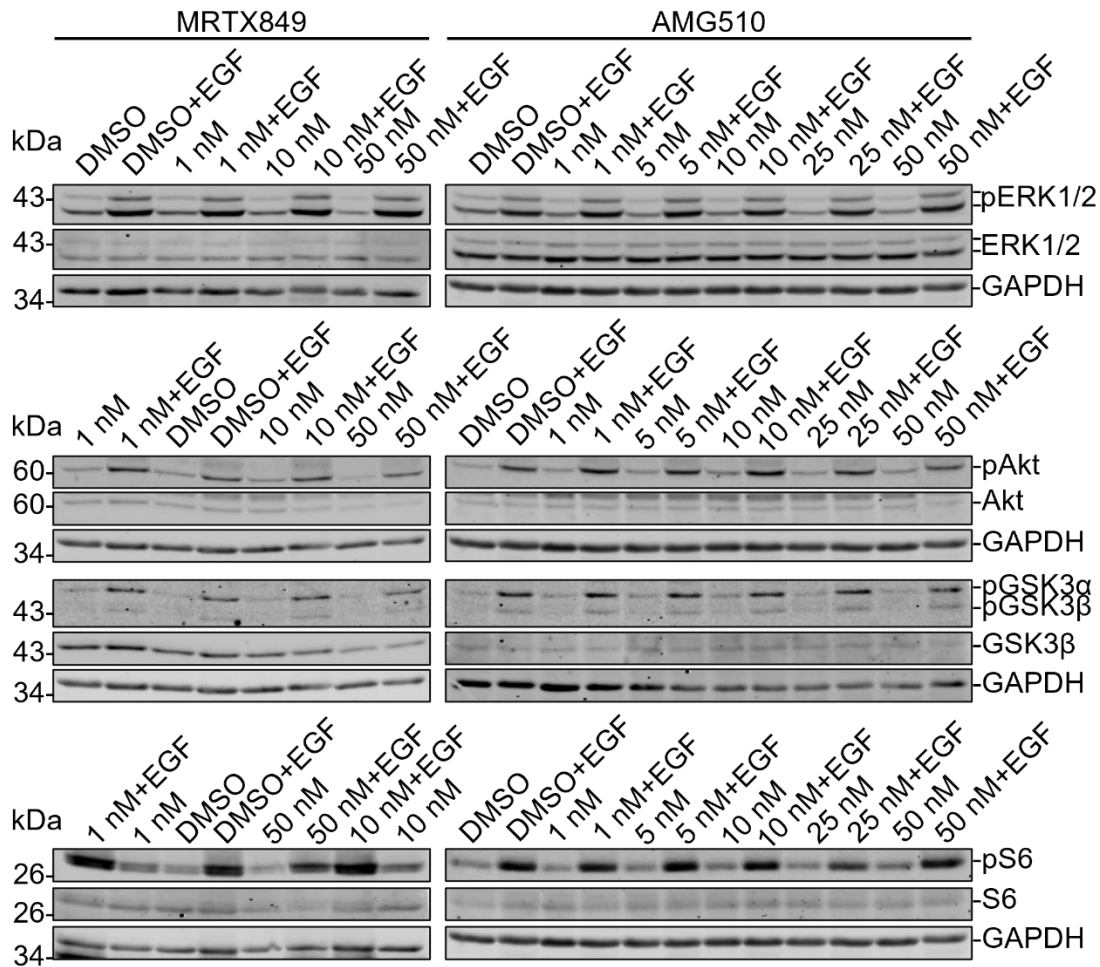


Abb. 8: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Aktivierbarkeit von ERK1/2, Akt, GSK3 α / β und S6 durch EGF in HCC-44-Zellen. Es erfolgte eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit MRTX849 bzw. AMG510 in serumfreiem Medium. 15 min vor der Zellyse wurden die Zellen mit 30 ng/mL EGF in serumfreiem Medium stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit DMSO bzw. DMSO+EGF inkubiert. In einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden pro Spur 50 μ g Proteinlysate aufgetrennt und die Proteine im Immunoblotverfahren im Odyssey SA- bzw. Odyssey CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System detektiert. Hierfür wurden Protein- und phospho-Protein-spezifische Antikörper verwendet. Der Nachweis von ERK1/2, Akt, GSK3 β , S6 und zusätzlich GAPDH dienten zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge (n=1).

Die Behandlung mit MRTX849 und AMG510 für 24 h führte in den H23-Zellen (Abb. 9) nicht zu einer Abnahme der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 und S6 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Aufgrund des fast vollständigen Verlustes der Phosphorylierung

von Akt und GSK3 α/β konnte hier keine verlässliche densitometrische Quantifizierung erfolgen. Jedoch lies sich der Einfluss der Inhibitoren auf diese Proteine anhand der deutlichen Phosphorylierung nach EGF-Stimulation messen. Die densitometrische Analyse ergab bei 25 nM MRTX849+EGF eine Abnahme des Gehalts an pAkt (0,39-fach) und pS6 (0,46-fach), jedoch keine Veränderung von pERK1/2 (0,85-fach) und eine leichte Zunahme des Gehalts von pGSK3 α/β (1,42-fach) im Vergleich zur DMSO+EGF-Kontrolle. Bereits nach Präinkubation mit 10 nM AMG510 nahm die EGF-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 (0,57-fach) und Akt (0,54-fach) ab, während der Gehalt an pGSK3 α/β (2,44-fach) zunahm und keine Veränderung von pS6 (0,76-fach) im Vergleich zur DMSO+EGF-Kontrolle auftrat.

Die EGF-Stimulation führte in den DMSO-behandelten H23-Zellen zu einer Zunahme von pERK1/2 auf das 1,37-fache (1,36; 1,38; n=2), pAkt auf das 9,65-fache (5,47; 13,83; n=2) und pGSK3 α/β auf das 2,75-fache (2,47; 3,03; n=2) verglichen mit den unstimulierten, DMSO-behandelten Zellen. Eine Induktion von S6 durch EGF wurde nicht gemessen (1,28-fach; 0,86-fach; n=2).

Beim Vergleich des Verhältnisses der EGF-stimulierten zur unstimulierten Probe wurde für die H23-Zellen ein Anstieg von pERK1/2 auf das 1,64-fache (25 nM MRTX849+EGF/ 25 nM MRTX849) bzw. auf das 3,11-fache (25 nM AMG510+EGF/ 25 nM AMG510) im Vergleich zum Verhältnis DMSO+EGF/ DMSO gemessen. Hingegen führte die geringere Aktivierbarkeit von S6 nach MRTX849-Präinkubation bei gleichbleibender basaler S6-Phosphorylierung zu einer geringeren Stimulierbarkeit von S6 auf das ca. 0,57-fache der Stimulierbarkeit des Kontrollansatzes. Aufgrund der geringen Phosphorylierung von Akt und GSK3 α/β nach Serumentzug kann zu diesen Proteinen keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Zusammengefasst zeigen die abgebildeten Daten, dass eine 24-stündige AMG510-Behandlung in den HCC-44-Zellen zu einer Abnahme der basalen Phosphorylierung von ERK1/2, Akt und S6 und zu einer Reduktion der EGF-induzierten Phosphorylierung von Akt und S6 führt. Für die Behandlung mit MRTX849 konnte eine Abnahme der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden.

In den H23-Zellen konnten nur Veränderungen nach EGF-Stimulation detektiert werden. Hier führte MRTX849 zu einer Abnahme der Phosphorylierung von Akt und S6 und AMG510 zu einer reduzierten Aktivität von ERK1/2 und Akt.

Die EGF-Stimulation führte in Zellen beider Zelllinien zu einer deutlichen Zunahme der Aktivität von ERK1/2, Akt, GSK3 α/β und in den HCC-44-Zellen auch von S6. Hingegen konnte für die H23-Zellen, wie schon in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben, keine Aktivierung von S6 durch EGF detektiert werden.

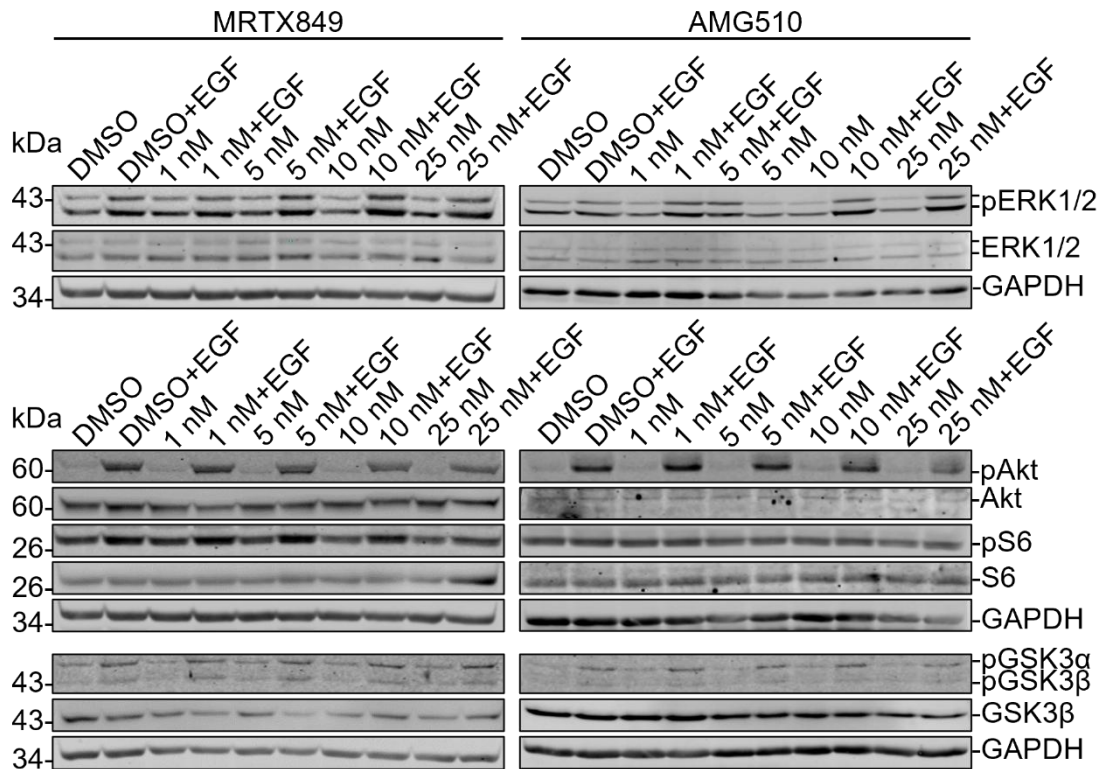


Abb. 9: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Aktivierbarkeit von ERK1/2, Akt, GSK3 α / β und S6 durch EGF in H23-Zellen. In serumfreiem Medium wurden H23-Zellen für 24 h mit MRTX849 bzw. AMG510 inkubiert und 15 min vor der Zellyse mit 30 ng/mL EGF in serumfreiem Medium stimuliert. DMSO- bzw. DMSO+EGF-inkubierte Zellen dienen als Kontrolle. 50 μ g Proteinlysate wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit phospho-Protein- bzw. Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren im Odyssey SA- bzw. CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL- System. Zur Detektion der eingesetzten Proteinmenge wurden ERK1/2, Akt, S6 und GSK3 β nachgewiesen. Der Nachweis von GAPDH diente als zusätzliche Beladungskontrolle (n=1).

3.1.2.3 Wirkung von MRTX849 und AMG510 auf ERK, Akt, GSK3 und S6 in HCC-44- und H23-Zellen für 24 h und 48 h

Um die Wirksamkeit der K-Ras G12C-Inhibition für 24 h und 48 h nach einmaliger Zugabe von MRTX849 und AMG510 zu den Zellen zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, GSK3 α / β und S6 mit Protein- und phospho-Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren nachgewiesen. Es wurden HCC-44- und H23-Zellen mit 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM und 50 nM MRTX849 bzw. AMG510 für 24 h und 48 h in Kulturmedium inkubiert und die Wirkung auf ausgewählte Signalproteine untersucht. Diese Versuche wurden ebenfalls mit einem n=1 durchgeführt, da weitere Versuche in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Die densitometrische Auswertung sowie die Aufführung der Densitometrie-Ergebnisse im Folgenden wurden bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Jedoch wurde in diesem Versuch der Gehalt von pERK1/2 in den H23-Zellen und der Gehalt von pERK1/2 in den MRTX849-behandelten HCC-44-

Zellen auf den Proteingehalt von GAPDH normiert. Abb. 10 bzw. Abb. 11 zeigen die Immunoblots mit den Proteinlysaten der HCC-44- bzw. H23-Zellen.

Abb. 10 zeigt, dass pERK1/2 in den HCC-44-Zellen bei 24 h und 48 h graduell bis auf das 0,55-fache (24 h) und auf das 0,40-fache (48 h) der DMSO-Kontrolle bei jeweils 25 nM AMG510 abnimmt. In der MRTX849-Kohorte zeigte die Phosphorylierung von ERK1/2 ebenfalls nach Inkubation mit 25 nM MRTX849 für 24 h eine Tendenz zur Abnahme (0,73-fach), blieb allerdings nach Inkubation mit MRTX849 für 48 h unverändert. In der 24 h-Kohorte ergab die densitometrische Analyse keine Veränderungen der Phosphorylierung von Akt in den MRTX849- und AMG510-inkubierten HCC-44-Zellen. Hingegen wurde für den Inkubationszeitraum von 48 h eine Zunahme von pAkt bei 50 nM AMG510 auf das 1,79-fache der DMSO-Kontrolle und bei 25 nM MRTX849 auf das 5,11-fache der DMSO-Kontrolle gemessen. Eine graduelle Abnahme der Phosphorylierung von S6 zeigte sich bei 24 h bis zur höchsten Abnahme auf das 0,46-fache der DMSO-Kontrolle bei 50 nM AMG510 und auf das 0,39-fache der DMSO-Kontrolle bei 25 nM MRTX849. Hier zeigte sich wiederum keine Abnahme von pS6 in der 48 h-Kohorte. Veränderungen der Phosphorylierung von GSK3 α/β nach Inkubation mit AMG510 für 24 h und 48 h wurden nicht detektiert.

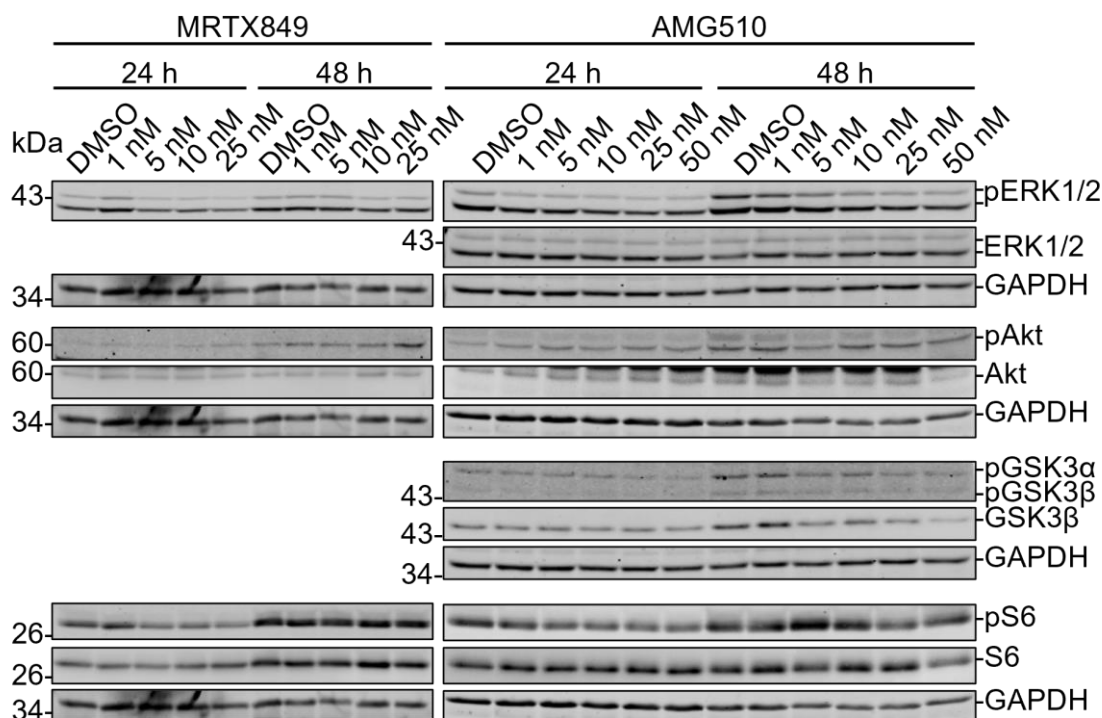


Abb. 10: Einfluss von MRTX849 und AMG510 für 24 h und 48 h auf ERK1/2, Akt, GSK3 α/β und S6 in HCC-44-Zellen. HCC-44-Zellen wurden für 24 h und 48 h in Kulturmedium mit MRTX849 bzw. AMG510 inkubiert. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Es wurden pro Spur 50 μ g Proteinlysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Immunoblotting im Odyssey SA- bzw. Odyssey CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System. Hierfür wurden Protein- und phospho-Protein-spezifische Antikörper verwendet. Der Nachweis von GAPDH diente als zusätzliche Beladungskontrolle (n=1).

Für die H23-Zellen (Abb. 11) wurde ebenfalls eine graduelle Abnahme von pERK1/2 mit steigender Konzentration von MRTX849 und AMG510 bei 24 h und 48 h detektiert. Dabei wurde die höchste Abnahme des pERK1/2-Gehalts bei 50 nM AMG510 (24 h: 0,51-fach; 48 h: 0,75-fach) und 50 nM MRTX849 (24 h: 0,23-fach; 48 h: 0,46-fach) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen. Die Phosphorylierung von Akt nahm bei 24 h graduell bis auf das 0,69-fache der DMSO-Kontrolle bei 25 nM AMG510 ab, blieb im Mittel nach Inkubation mit AMG510 für 48 h bis auf eine Zunahme bei 10 nM AMG510 auf das 2,93-fache der DMSO-Kontrolle unverändert. In der MRTX849-Kohorte trat nach Behandlung der H23-Zellen mit 50 nM MRTX849 für 24 h (1,50-fach) und 48 h (1,90-fach) eine Zunahme von pAkt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf. Veränderungen der Phosphorylierung von S6 konnten in MRTX849- und AMG510-inkubierten H23-Zellen bei 24 h und 48 h nicht detektiert werden.

Anhand der abgebildeten Daten kann zusammengefasst werden, dass in AMG510-inkubierten HCC-44-Zellen bei 24 h und 48 h die ERK1/2-Aktivität abnimmt. Die AMG510- und MRTX849-behandelten H23-Zellen wiesen eine Abnahme der ERK1/2-Aktivität bei 24 h und 48 h auf, zeigten aber wiederum keine Veränderungen der Phosphorylierung von S6.

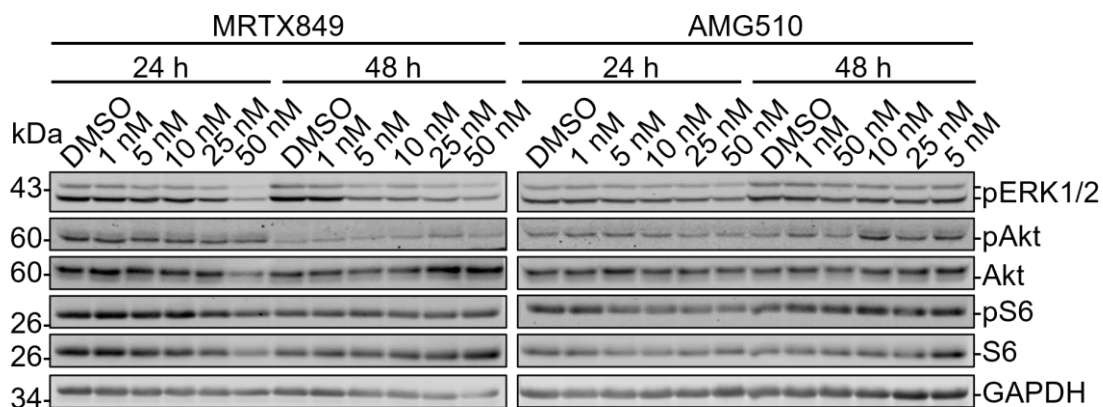


Abb. 11: Einfluss von MRTX849 und AMG510 für 24 und 48 h auf ERK1/2, Akt und S6 in H23-Zellen. H23-Zellen wurden für 24 h und 48 h in Kulturmedium mit MRTX849 bzw. AMG510 inkubiert. Als Kontrollansatz dienen DMSO-behandelte Zellen. Pro Spur wurden 50 µg Proteinlysät in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit (phospho-) Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren. Die Detektion erfolgte im Odyssey SA- bzw. Odyssey CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System. Der Nachweis von Akt, S6 und GAPDH diene als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge (n=1).

3.1.2.4 Einfluss des FCS-Gehalts des Mediums auf die Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren in HCC-44- und H23-Zellen

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die Wirkung von AMG510 oder MRTX849 durch den FCS-Gehalt des Mediums beeinflusst wird. Hierfür erfolgte eine vergleichende Analyse der in den vorherigen Kapiteln (siehe Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3) dargestellten Lysat-Proben, die für 24 h in serumfreiem Medium bzw. in FCS-haltigem Medium mit MRTX849 oder AMG510 behandelt wurden. Die Behandlung der HCC-44- und H23-Zellen mit MRTX849 bzw. AMG510 sowie der Nachweis und die densitometrische Auswertung der Aktivität der Signaltransduktionsmoleküle ERK1/2, Akt und S6 erfolgte wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben (siehe Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3). In Klammern sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung als Einzelwerte angegeben (n=1). DMSO-behandelte Zellen dienten wiederum als Kontrolle. Für die HCC-44-Zellen (Abb. 12) konnte eine graduelle Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl in der FCS-haltigen als auch in der serumfreien Kohorte für MRTX849 und AMG510, verglichen mit den Kontrollzellen, nachgewiesen werden. (höchste Abnahme von pERK1/2: MRTX849: 50 nM: 0,34-fach (DMEM); 25 nM: 0,41-fach (FCS); AMG510: 25 nM: 0,30-fach (DMEM); 10 nM: 0,49-fach (FCS); n=1). In AMG510-behandelten HCC-44-Zellen nahm der Gehalt an pAkt in der FCS-haltigen und serumfreien Kohorte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle hingegen nahezu graduell zu (DMEM, 50 nM: 1,83-fach; FCS, 50 nM: 2,21-fach; n=1). Für eine quantitative Bestimmung des pAkt-Gehalts in der FCS-MRTX849-Fraktion war die Signalintensität zu gering. Veränderungen des pS6-Proteingehalts in der MRTX849- und AMG510-Fraktion wurden weder nach Behandlung in serumfreiem noch in FCS-haltigem Medium gemessen.

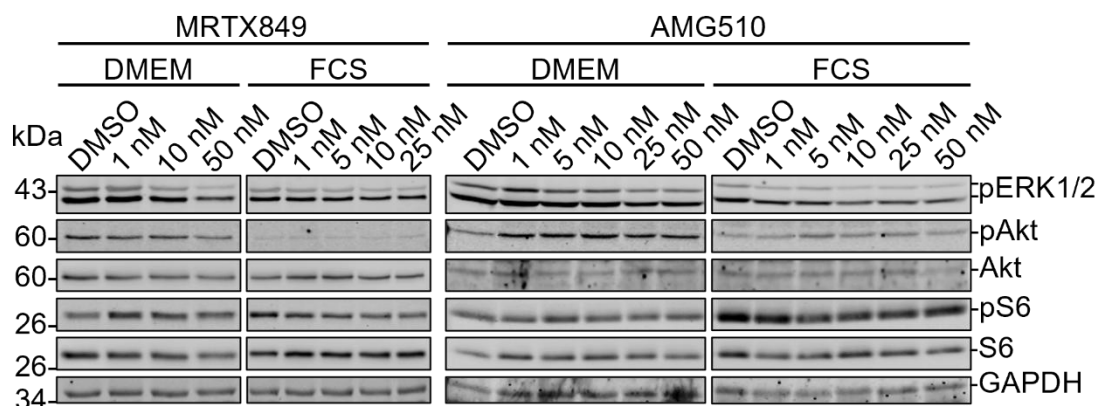


Abb. 12: Untersuchung der Aktivität von ERK1/2, Akt und S6 in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen nach Inkubation in FCS-haltigem und serumfreiem Medium. HCC-44-Zellen wurden für 24 h mit MRTX849 bzw. AMG510 in serumfreiem Medium (DMEM) und Kulturmedium (10 % FCS) inkubiert. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrollansatz. Es wurden 40 µg (MRTX849) bzw. 50 µg (AMG510) Proteinlysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren im Odyssey SA- bzw. CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL-System. Der Nachweis von GAPDH diente als zusätzliche Beladungskontrolle (n=1).

Ebenso wie in den HCC-44-Zellen nahm auch in H23-Zellen (Abb. 13) die Aktivität von ERK1/2 graduell bei beiden K-Ras G12C-Inhibitoren sowohl in der serumfreien- als auch in der FCS-Kohorte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ab (höchste Abnahme von pERK1/2: MRTX849: 25 nM: 0,60-fach (DMEM); 50 nM: 0,18-fach (FCS); AMG510: 25 nM: 0,59-fach (DMEM); 50 nM: 0,65-fach (FCS); n=1). Die Signalintensität der Akt-Phosphorylierung war für eine quantitative Analyse in der serumfreien-MRTX849- und AMG510-Kohorte zu gering. Tendenziell zeigte sich jedoch in Zusammenschau mit der Gesamtmenge von Akt keine Veränderung des pAkt-Gehalts in der serumfreien und der FCS-haltigen Fraktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die densitometrische Analyse von pS6/S6 ergab in den H23-Zellen nur eine Abnahme der Phosphorylierung von S6 in der FCS-Kohorte (50 nM MRTX849: 0,23-fach; 50 nM AMG510: 0,24-fach; n=1), nicht aber in der serumfreien Kohorte.

Zusammengefasst zeigen die aufgeführten Daten für die MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44- und H23-Zellen die gleichen Tendenzen der Aktivität von ERK1/2 und Akt und in HCC-44-Zellen auch für S6 in der serumfreien- und FCS-Kohorte. Lediglich die Phosphorylierung von S6 zeigte unterschiedliche Tendenzen in den H23-Zellen der serumfreien- und der FCS-Kohorte.

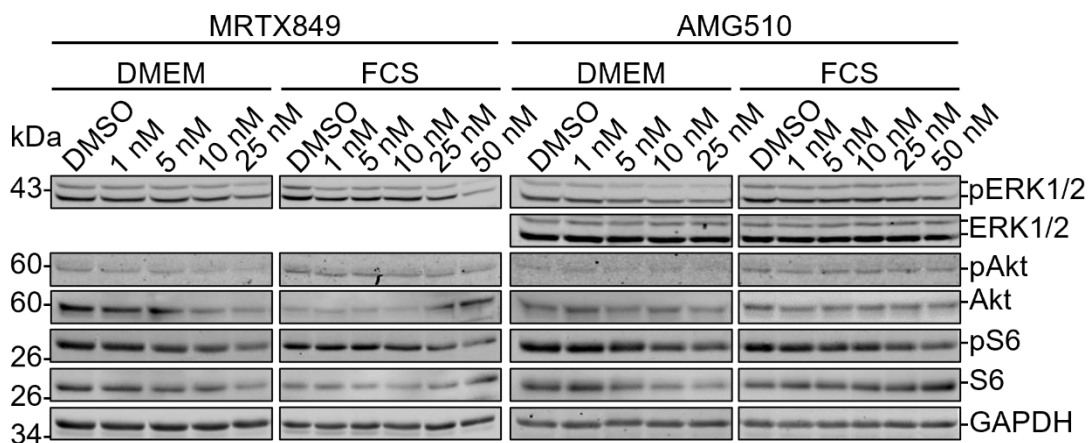


Abb. 13: Einfluss des Serumgehalts des Kulturmediums auf die K-Ras G12C-Inhibition in H23-Zellen. H23-Zellen wurden für 24 h mit MRTX849 bzw. AMG510 in serumfreiem Medium (DMEM) und Kulturmedium mit 10 % FCS (FCS) inkubiert. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Es wurden 50 µg Proteinlysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunoblotverfahren im Odyssey SA- bzw. Odyssey CLx-System oder im Fusion SL4-3500 WL- System. Für die Detektion von pERK1/2, ERK1/2, pAkt, Akt, pS6, S6 und GAPDH wurden spezifische Antikörper verwendet. Der Nachweis von Akt, ERK1/2 und S6 diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge und der Nachweis von GAPDH als zusätzliche Beladungskontrolle (n=1).

Abschließend lässt sich in Zusammenschau der Daten aus den Versuchsreihen zur Charakterisierung der Wirkung von MRTX849 und AMG510 schlussfolgern, dass beide verwendeten K-Ras G12C-Inhibitoren die Aktivität der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle in HCC-44- und H23-Zellen beeinflussen. Sowohl in HCC-44- als auch in H23-Zellen konnte zunächst eine EGF-induzierte Stimulation von ERK1/2, Akt und GSK3 α nachgewiesen werden. Die AMG510-Präinkubation wiederum führte bei 2 h und 24 h in Zellen beider Zelllinien zur Verminderung der EGF-induzierten Stimulation von Akt sowie von ERK1/2 in H23-Zellen. In HCC-44-Zellen führte vor allem AMG510 zur Abnahme der basalen Aktivität von ERK1/2, Akt und S6. Eine Abnahme der basalen Phosphorylierung von ERK1/2 und S6 konnte auch in MRTX849-behandelten HCC-44-Zellen beobachtet werden. In H23-Zellen führten MRTX849 und AMG510 vor allem zur Abnahme sowohl der basalen als auch der EGF-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt. Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit den in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl vorliegenden Daten bzw. durchgeführten Versuchen überein. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde außerdem in weiteren Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Kontrolle der Wirkung von MRTX849 und AMG510 nachgewiesen.

Anhand dieser Versuchsreihe konnte außerdem die Konzentration der Inhibitoren für weitere Versuche festgelegt werden, bei denen die Zellen für bis zu 144 h mit MRTX849 und AMG510 inkubiert wurden. Dabei war es wichtig eine Konzentration zu wählen, bei der Effekte der Inhibitoren erkennbar waren, die Zellen aber keine deutlichen apoptotischen Merkmale aufwiesen. Aufgrund der Halbwertszeit von 24,7 h für MRTX849 und 5,5 h für AMG510 (64) und weil teilweise keine Abnahme der Aktivität von Akt und ERK1/2 nach Inkubation der Zellen mit MRTX849 und AMG510 für 48 h nachgewiesen werden konnte, wurde in den folgenden Versuchen alle 24 h das Kulturmedium gewechselt und erneut Inhibitor zu den Zellen gegeben. Dadurch sollte eine ausreichende Menge der K-Ras G12C-Inhibitoren über den Versuchszeitraum in den Zellen gewährleistet werden, sodass K-Ras G12C über den kompletten Inkubationszeitraum inhibiert in den Zellen vorliegt.

3.2 Charakterisierung des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibition auf Proteine des Zytoskeletts

In Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl zur Wirkung von AMG510 und MRTX849 konnten deutliche morphologische Veränderungen der behandelten Zellen beobachtet werden (K. Giehl, persönliche Kommunikation). Im Folgenden wurden deshalb die Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf Proteine des Zytoskeletts und den möglichen Umbau des Zytoskeletts untersucht. Hierfür wurden neben Zellen der Lungenkarzinomzelllinien H23 (G12C/WT (85)) und HCC-44 (G12C/G12C (85)) auch Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 verwendet, die eine homozygote (G12C/G12C) K-Ras G12C-Mutation aufweisen (36). Für die nachfolgenden Versuche wurden die Zellen für 16 h, 48 h, 96 h und 144 h mit MRTX849 und AMG510 in Kulturmedium inkubiert, wobei alle 24 h ein Wechsel des Kulturmediums mit erneuter Zugabe der Inhibitoren erfolgte. Für MIA PaCa-2-Zellen wurden 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 verwendet. Die Behandlung der HCC-44- und H23-Zellen erfolgte mit 10 nM oder 20 nM MRTX849 und 20 nM AMG510, wobei beim Wechsel des Kulturmediums entweder die oben genannte Konzentration von MRTX849 und AMG510 oder, in einigen Versuchen, 1/10 der ursprünglichen Konzentration verwendet wurde. Zur Kontrolle wurden Zellen mit DMSO inkubiert. In den MIA PaCa-2-Zellen wurde zunächst mittels Immunoblotting die Bindung von MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C untersucht. Zur Dokumentation morphologischer Veränderungen der Zellen durch die K-Ras G12C-Inhibitoren wurden Phasenkontrastaufnahmen angefertigt. Weiterhin wurde mittels Tritonfraktionierung und Immunoblotting der Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Proteinexpression von Vimentin, E-Cadherin, β -Catenin, p120Catenin, Paxillin und Keratin in den MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen untersucht. Zudem erfolgte die Analyse der Vimentin-Genexpression mittels RT-qPCR in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen. Abschließend wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Wirkung von MRTX849 und AMG510 auf Aktinfilamente, auf die Aktin-assoziierten Proteine Vinkulin und Paxillin, auf die Intermediärfilamente Vimentin und Keratin und auf die Verteilung von β -Catenin in den MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen untersucht. Anhand der Immunfluoreszenzfärbungen wurden zudem Veränderungen der Zellfläche und der Anzahl Vinkulin- und Paxillin-haltiger Fokalkontakte in den MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition quantifiziert.

3.2.1 Bindung von MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C in MIA PaCa-2-Zellen

Die Bindung der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C wurde im Immunoblotverfahren untersucht. Dies gelang aufgrund der Tatsache, dass K-Ras G12C allein ein niedrigeres Molekulargewicht als der Komplex aus K-Ras G12C-MRTX849 bzw. -AMG510 besitzt, was zu einer kürzeren Laufstrecke des Komplexes im SDS-Polyacrylamidgel führt.

MIA PaCa-2-Zellen wurden für 48 h, 96 h und 144 h in Kulturmedium mit 20 nM MRTX849, 20 nM AMG510 und zur Kontrolle mit DMSO inkubiert. Nach jeweils 24 h Inkubationszeit erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums mit Zugabe von DMSO, MRTX849 bzw. AMG510. Die Zellen wurden in 1 x RIPA-Lysepuffer lysiert und die Zelllysate in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Immunoblotverfahren im Odyssey CLx-System mit dem Ras-Antikörper OP40, der alle Ras-Isoformen erkennt und bereits gut in der Arbeitsgruppe etabliert ist. Für den Inkubationszeitraum von 96 h wurde K-Ras4B zusätzlich mit dem Antikörper K-Ras2B, welcher spezifisch an K-Ras4B bindet (125), nachgewiesen.

In Abb. 14 ist zu erkennen, dass nach Inkubation der MIA PaCa-2-Zellen mit MRTX849 und AMG510 für 48 h, 96 h und 144 h die obere Bande der Ras-Doppelbande im Vergleich zur oberen Bande der DMSO-Kontrolle einen *Shift* im Molekulargewicht nach oben zeigt. In der Überlagerung von K-Ras4B und Ras zeigte sich die Lokalisation von K-Ras4B in der oberen Bande. Die Bindung von AMG510 induzierte einen etwas größeren *Shift* im Molekulargewicht als MRTX849. Dieser Versuch zeigt, dass die K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C binden und alle K-Ras G12C-Moleküle mit dem jeweiligen Inhibitor im Komplex vorliegen, da sich andernfalls eine Doppelbande zeigen würde.

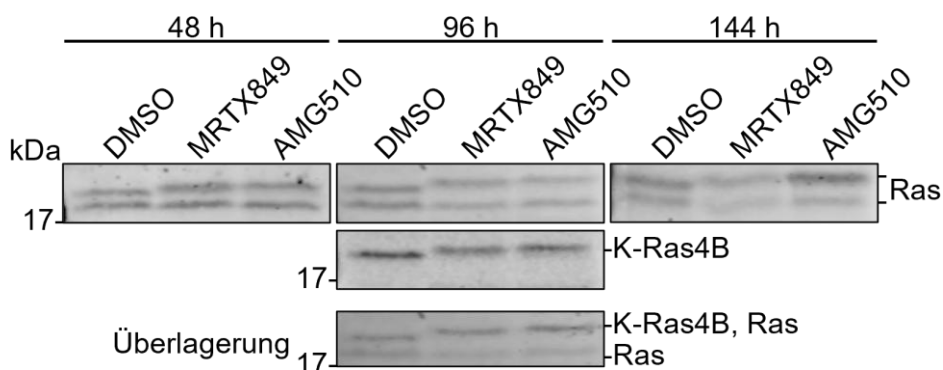


Abb. 14: MRTX849 und AMG510 binden an K-Ras G12C in MIA PaCa-2-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h, 96 h und 144 h mit DMSO, 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 in Kulturmedium inkubiert. 50 µg Proteinlysate wurden in einem 12,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Immunoblotting im Odyssey CLx-System. Verwendet wurden die spezifischen Ras-Antikörper OP40 und K-Ras2B. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle (n=1).

3.2.2 Veränderungen der Morphologie von H23-, HCC-44- und MIA PaCa-2-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition

Um morphologische Veränderungen der MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen, die durch Inhibition von K-Ras G12C durch MRTX849 und AMG510 auftraten, zu dokumentieren, wurden Phasenkontrastaufnahmen angefertigt.

Hierfür wurden H23-, HCC-44- und MIA PaCa-2-Zellen mit MRTX849 und AMG510 für 48 h bis 144 h in Kulturmedium inkubiert. Die H23- und HCC-44-Zellen wurden mit 10 nM MRTX849 und 20 nM AMG510, die MIA PaCa-2-Zellen mit 20 nM MRTX849 und 20 nM AMG510 inkubiert. Alle 24 h erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums mit erneuter Zugabe von DMSO, MRTX849 bzw. AMG510. Am Inversmikroskop Axiovert (Zeiss) wurden alle 24 h in 20-facher Vergrößerung in Anwesenheit der Inhibitoren Phasenkontrastaufnahmen angefertigt. Repräsentative Aufnahmen sind in 50Abb. 15, Abb. 16 und Abb. 17 abgebildet.

Die MIA PaCa-2-Kontrollzellen (Abb. 15) wiesen eine heterogene Morphologie mit schmalen, langgestreckten (schwarze Pfeile in Abb. 15 A-E) bis polygonalen Zellen auf (blaue Pfeile in Abb. 15 A-E). Nach Inkubation mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 zeigten die MIA PaCa-2-Zellen weniger Zellausläufer, was zu einer breiteren, polygonalen und rundlich imponierenden Zellform führte (Pfeile in Abb. 15 F-O). Zellen mit schmaler, langgestreckter Morphologie waren nach der Behandlung mit beiden K-Ras G12C-Inhibitoren kaum nachweisbar. Die morphologischen Veränderungen in den MRTX849- und AMG510-behandelten Zellen begannen deutlich nach 72-stündiger Inkubation und waren bei 144 h am stärksten ausgeprägt (siehe Abb. 15). Außerdem schienen die MRTX849- und AMG510-inkubierten MIA PaCa-2-Zellen verglichen mit den DMSO-Kontrollzellen größer zu werden, was durch die Messung der Zellfläche bestätigt wurde (siehe Kapitel 3.4).

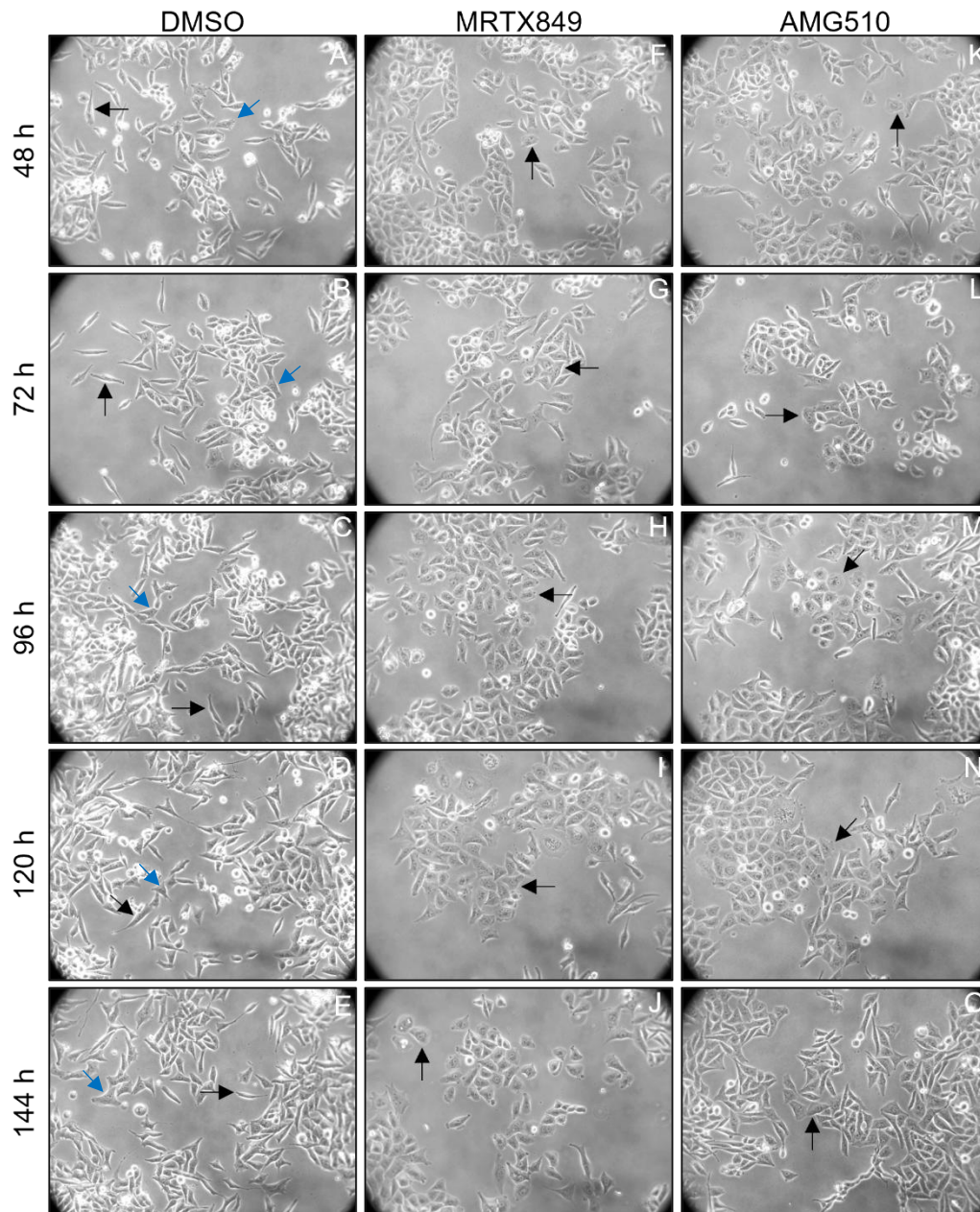


Abb. 15: MRTX849 und AMG510 beeinflussen die Zellmorphologie von MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden mit DMSO bzw. 20 nM MRTX849 oder AMG510 für 48 h bis 144 h in Kulturmedium inkubiert. Zur Dokumentation wurden Phasenkontrastaufnahmen am Inversmikroskop Axiovert (Zeiss) in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Abgebildet sind ausgewählte Aufnahmen aus je 3-5 Bildern je durchgeführtem Versuch (n=3).

In Abb. 16 ist erkennbar, dass die Kontrollzellen der HCC-44-Zellen einen länglichen Zellkörper besitzen und teils Zellausläufer ausbilden (Pfeile in Abb. 16 A-E). Nach MRTX849- und AMG510-Behandlung (10 nM MRTX849, 20 nM AMG510) bildeten die HCC-44-Zellen weniger dieser Zellausläufer aus, wodurch die Zellform dieser Zellen ebenfalls rundlicher imponierte (Pfeile in Abb. 16 F-O). Zudem schienen die HCC-44-

Zellen nach Behandlung mit beiden K-Ras G12C-Inhibitoren ebenfalls größer zu werden, was, wie für die MIA PaCa-2-Zellen, durch Quantifizierung der Zellfläche bestätigt wurde (siehe Kapitel 3.4).

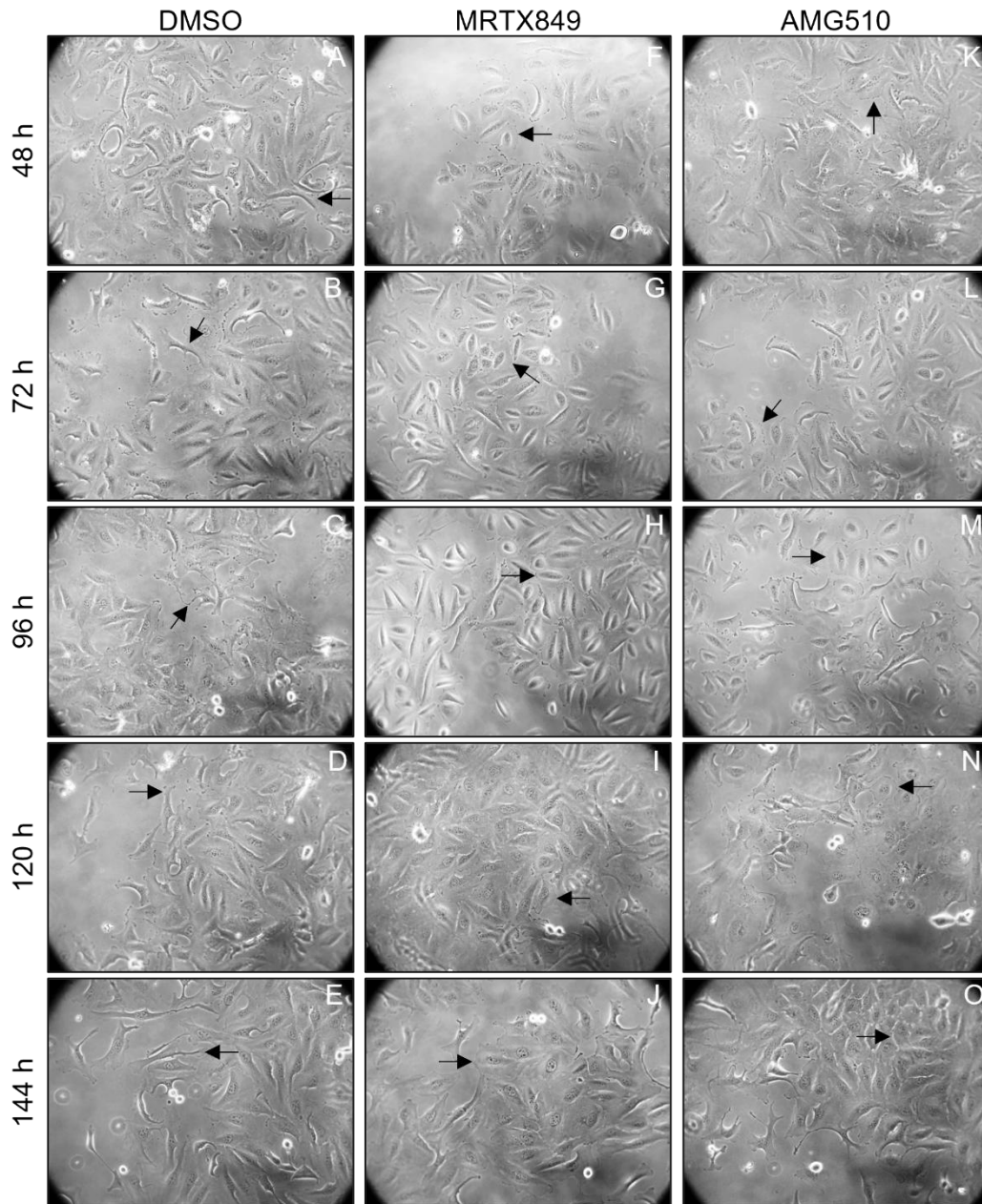


Abb. 16: Phasenkontrastaufnahmen der HCC-44-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition. HCC-44-Zellen wurden mit DMSO, 10 nM MRTX849 oder 20 nM AMG510 für 48 h bis 144 h in Kulturmedium inkubiert. Phasenkontrastaufnahmen wurden am Inversmikroskop Axiovert (Zeiss) in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Aus je 3-5 Aufnahmen je durchgeführtem Versuch sind ausgewählte Aufnahmen abgebildet (n=3-4).

DMSO-behandelte H23-Zellen (Abb. 17) wiesen einen heterogenen Phänotyp mit unterschiedlicher Morphologie auf. Einige der Zellen waren fibroblastenartig verzweigt (schwarze Pfeile in Abb. 17 A-E), andere hingegen eher rundlich und ohne Zellausläufer (blaue Pfeile in Abb. 17 A-E). Die K-Ras G12C-Inhibition der H23-Zellen mit 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 führte, wie bereits in den HCC-44- und MIA PaCa-2-Zellen, zu einer rundlich imponierenden Zellform (Pfeile in Abb. 17 F-O).

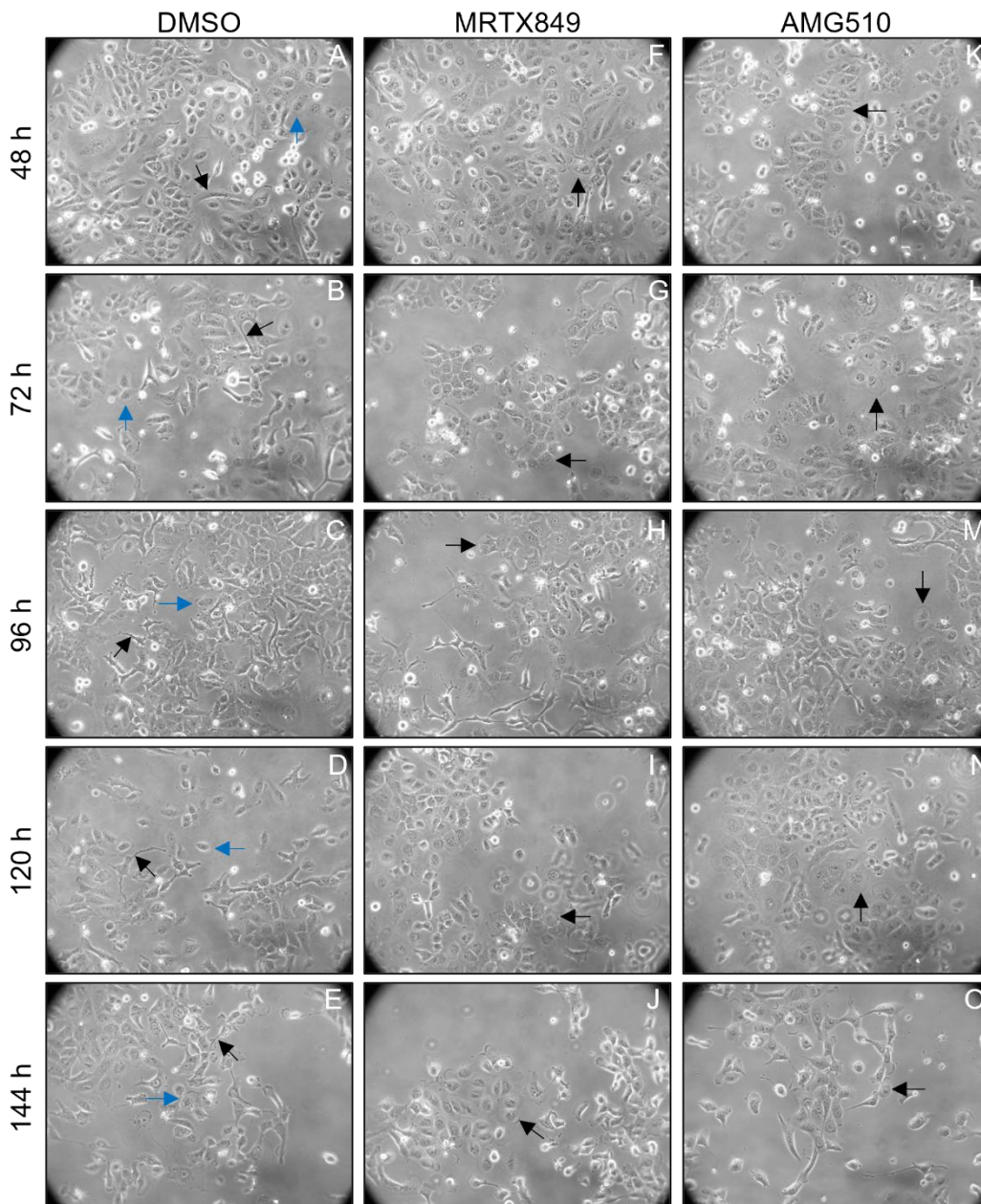


Abb. 17: Phasenkontrastaufnahmen zur Beurteilung der Morphologie der H23-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition. In Kulturmedium wurden H23-Zellen mit DMSO, 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 für 48 h bis 144 h inkubiert. Die abgebildeten Phasenkontrastaufnahmen wurden am Inversmikroskop Axiovert (Zeiss) in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Repräsentative Aufnahmen aus je 3-5 Bildern je durchgeführtem Versuch sind abgebildet (n=3).

3.2.3 Untersuchung der Wirkung der K-Ras G12C-Inhibition auf Vimentin und Zytoskelett-assoziierte Proteine im Immunoblotverfahren

Nachdem in den Phasenkontrastaufnahmen Veränderungen der Zellmorphologie in den Inhibitor-behandelten Zellen beobachtet wurden, wurden im Folgenden die Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibition mit MRTX849 und AMG510 auf das mesenchymale Markerprotein Vimentin, auf das Intermediärfilamentprotein Keratin und auf Zytoskelett-assoziierte Proteine in MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen in Gesamtzell-Lysaten mittels Immunoblotanalysen untersucht, um mögliche Hinweise auf eine epithelial-mesenchymale Transition zu erlangen. Die Veränderungen der Proteinexpression wurden über einen Zeitraum von 16 h bis 144 h untersucht.

Zur Dosisfindung wurden die HCC-44- und H23-Zellen zunächst mit 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 für 96 h und 144 h inkubiert, wobei anfänglich beim Wechsel des Kulturmediums alle 24 h abwechselnd die oben genannte Inhibitorkonzentration und 1/10 der ursprünglichen Konzentration verwendet wurde. Da die Zellen während der Inkubation mit dieser Inhibitorkonzentration keine deutlichen apoptotischen Merkmale aufzeigten, wurde in weiteren Versuchen immer die ursprüngliche Inhibitorkonzentration von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 zu den Zellen gegeben. Die HCC-44- und H23-Zellen überlebten auch eine Inkubation mit einer nochmals erhöhten MRTX849-Konzentration von 20 nM. Für die MIA PaCa-2-Zellen wurden 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 verwendet. Da alle Zellen auch die Inkubation mit der höchsten Dosis überlebten und bei Betrachtung der zu analysierenden Proteine keine gravierenden unterschiedlichen Tendenzen im Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen festgestellt wurden, wurden bei der Auswertung alle durchgeführten Versuche mit den soeben beschriebenen Konzentrationen einbezogen. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind in den Abbildungen dieses Kapitels durch blaue Punkte für die abwechselnde Verwendung von 1/10 der Konzentration und der ursprünglichen Konzentration, grüne Punkte für 10 nM MRTX849 und schwarze Punkte für 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 gekennzeichnet. Zur Kontrolle wurden auch hier Zellen mit DMSO inkubiert.

Die Zellen wurden für 16 h, 48 h, 96 h und 144 h mit DMSO bzw. der jeweiligen Inhibitorkonzentration inkubiert und anschließend in 1 x RIPA-Lysepuffer lysiert. Die Proteinlysate wurden, wenn nicht anders beschrieben in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mittels Immunoblotverfahren im Odyssey CLx-System detektiert. Der Nachweis der Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 (pVimSer38) und Ser83 (pVimSer83) sowie der Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgte mit phospho-spezifischen Antikörpern. Der Nachweis der Phosphorylierung von ERK1/2 diente zur Kontrolle der Wirkung der Inhibitoren. Die Signalintensität der Banden

wurde densitometrisch analysiert, wobei phosphoryliertes Vimentin auf die Vimentin-Gesamtmenge bezogen wurde. Alle anderen Proteine wurden auf ihre jeweilige GAPDH-Beladungskontrolle bezogen. Als Referenzwert, welcher auf 1 gesetzt wurde, diente der Proteingehalt der jeweiligen DMSO-Kontrolle. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Bei ein- oder zweimaliger Versuchsdurchführung sind die Einzelwerte der densitometrischen Bestimmung angegeben. Die vollständigen Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 im Anhang aufgelistet.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde der Einfluss von MRTX849 und AMG510 für 16 h auf pVimSer38, pVimSer83 und auf den Vimentin-Proteingehalt in MIA PaCa-2-Zellen untersucht (Abb. 18). Dabei zeigte sich vor allem nach Behandlung mit AMG510 eine Verringerung von pVimSer38, pVimSer83 und Vimentin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. In MRTX849-inkubierten Zellen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle noch eine leichte Abnahme von pVimSer38 auf das 0,78-fache (0,78; 0,77; n=2), aber keine Veränderungen des pVimSer83- und Vimentin-Gehalts. In beiden Versuchen führten MRTX849 und AMG510 zu einer Abnahme von pERK1/2 im Vergleich zur Kontrolle, was die Wirkung der Inhibitoren für den 16-stündigen Inkubationszeitraum in MIA PaCa-2-Zellen bestätigt.

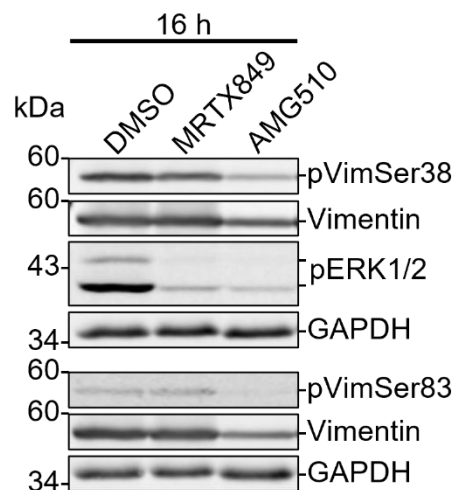


Abb. 18: Analyse des Einflusses von MRTX849 und AMG510 auf Vimentin, pVimSer38, pVimSer83 und pERK1/2 für 16 h in MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 16 h mit 20 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 in Kulturmedium inkubiert. Es wurden 50 μ g Proteinlysate in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Immunoblotting und Protein- bzw. phospho-Protein-spezifischer Antikörper wurden die jeweiligen Proteine im Odyssey CLx-System detektiert. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. Der Nachweis von GAPDH diente als Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (n=2).

Im nächsten experimentellen Ansatz wurde die Wirkung einer längeren MRTX849- bzw. AMG510-Behandlung der MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen für 48 h bis 144 h auf Vimentin, pVimSer38, pVimSer83 und E-Cadherin untersucht.

In MIA PaCa-2-Zellen (Abb. 19) führte die Inkubation mit AMG510 für 48 h, wie bereits bei der 16-stündigen Kurzinkubation, zu einer leichten Abnahme des Vimentin-Proteingehalts auf das $0,86 \pm 0,12$ -fache (SD; n=6) der DMSO-Kontrolle. Dies konnte nicht für die MRTX849-behandelten MIA PaCa-2-Zellen beobachtet werden. Ab einem Behandlungszeitraum von 96 h und 144 h konnte eine leichte Zunahme von Vimentin bei MRTX849 und AMG510 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden, die aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist. Die Phosphorylierung von Vimentin an Serin38 nahm in den MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen bei 48 h bis 144 h im Vergleich zur Kontrolle moderat ab, was sich bereits bei der 16-stündigen Inkubation für AMG510 abzeichnete. Für den Inkubationszeitraum von 48 h wurde auch der Gehalt von der an Serin83 phosphorylierten Form von Vimentin in den MIA PaCa-2-Zellen untersucht. Die densitometrische Analyse ergab hierfür eine Zunahme von pVimSer83 in den MRTX849-inkubierten Zellen (1,77-fach; 1,93-fach; n=2) und eine Abnahme in den AMG510-inkubierten Zellen (0,36-fach; 0,81-fach; n=2) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung nicht gezeigt). Der Nachweis von E-Cadherin gelang in den MIA PaCa-2-Zellen nicht (Abbildung nicht gezeigt), da diese Zellen kein E-Cadherin exprimieren (31, 92).

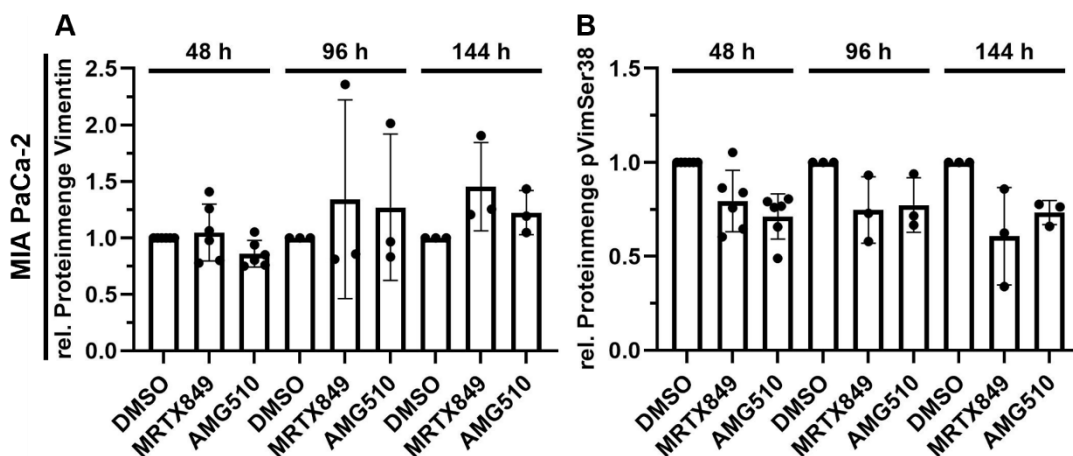


Abb. 19 A, B: Veränderungen des Proteingehalts von Vimentin (A) und pVimSer38 (B) in MRTX849- bzw. AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 48 h, 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO inkubiert. 50 µg Proteinlysate wurden in einem 10 %igen-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von Vimentin und pVimSer38 sowie GAPDH (Beladungskontrolle) erfolgte mit (phospho-) Protein-spezifischen Antikörpern mittels Immunoblotting im Odyssey CLx-System. Abgebildet ist die densitometrische Auswertung im Balkendiagramm als Mittelwert der relativen Signalstärke \pm SD in Relation zur DMSO-Kontrolle (48 h: n=6; 96 h, 144 h: n=3).

Für die HCC-44- und H23-Zellen (Abb. 20) zeigte sich, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, nach 48-stündiger AMG510-Behandlung ebenso eine geringe Abnahme des Vimentin-Proteingehalts auf das $0,80 \pm 0,15$ -fache (SD; n=5) in den HCC-44-Zellen und auf das 0,69-fache (n=1) in den H23-Zellen. Eine tendenzielle Zunahme von Vimentin wiederum wurde in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen bei 96 h im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Für die H23-Zellen zeigte sich nach AMG510-Behandlung bei 96 h und geringer nach MRTX849-Behandlung bei 144 h ebenfalls ein leichter Anstieg des Vimentin-Proteingehalts im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Eine Abnahme der Phosphorylierung von Vimentin an Serin38 wurde für die HCC-44-Zellen bei 48 h nach MRTX849- ($0,77 \pm 0,13$ -fach; SD; n=5) und AMG510-Behandlung ($0,74 \pm 0,17$ -fach; SD; n=5) im Vergleich zur Kontrolle gemessen, was ebenfalls in den MIA PaCa-2-Zellen beobachtet wurde. Für die H23-Zellen wurde der Gehalt an pVimSer38 einmalig nach 48-stündiger MRTX849- (0,84-fach; n=1) und AMG510-Behandlung (0,72-fach; n=1) untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der MIA PaCa-2-Zellen blieb der pVimSer38-Proteingehalt in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen bei 96 h unverändert. Bei 144 h zeigte sich eine geringe Zunahme auf das $1,31 \pm 0,01$ -fache (SD; n=2) nach MRTX849-Behandlung und auf das $1,72 \pm 0,55$ -fache (SD; n=2) nach AMG510-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

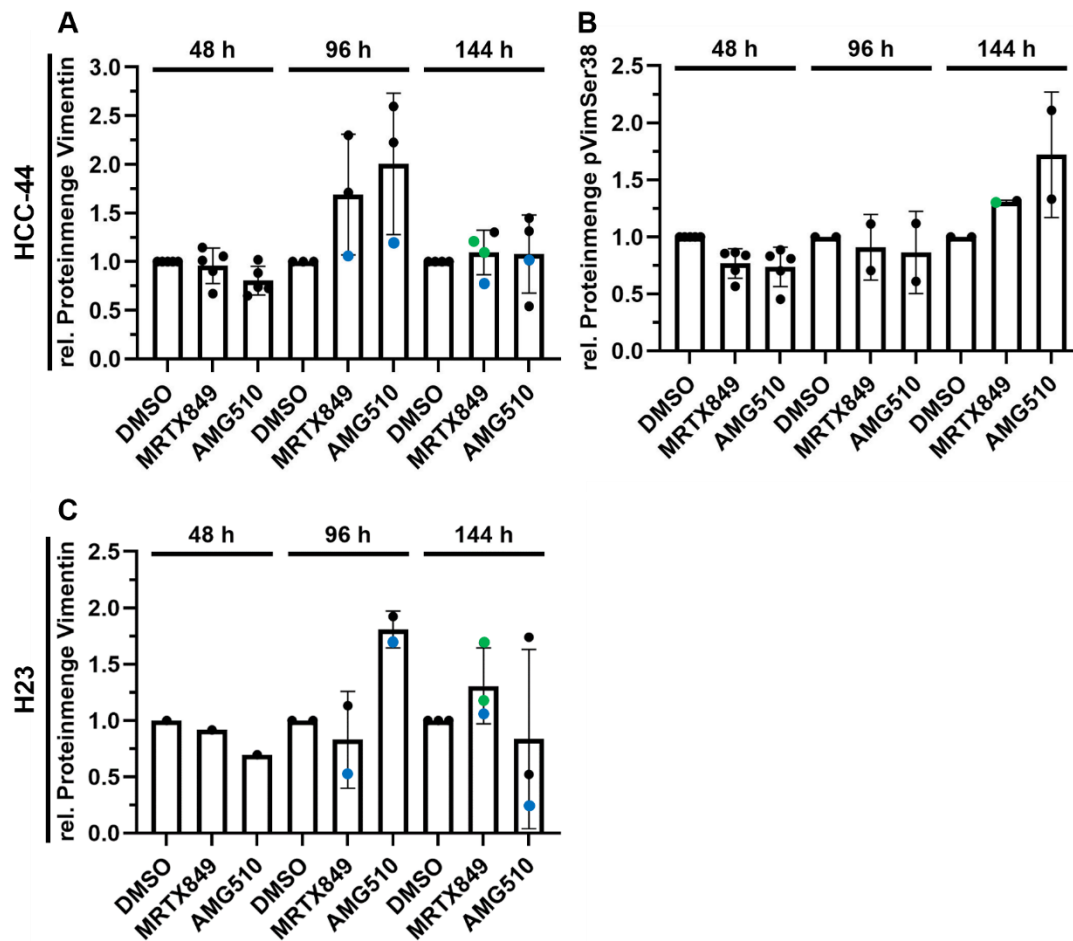


Abb. 20 A, B, C: Veränderungen des Vimentin- und pVimSer38-Gehalts nach K-Ras G12C-Inhibition in HCC-44-Zellen (A, B) und H23-Zellen (C). HCC-44- und H23-Zellen wurden mit MRTX849 bzw. AMG510 für 48 h, 96 h und 144 h in Kulturmedium inkubiert. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind anhand blauer (alle 24 h Wechsel von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 und 1 nM MRTX849 bzw. 2 nM AMG510), grüner (10 nM MRTX849) oder schwarzer Punkte (20 nM MRTX849 bzw. AMG510) visualisiert. DMSO inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. In einem SDS-Polyacrylamidgel wurden 50 µg Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von Vimentin, pVimSer38 und GAPDH zur Beladungskontrolle erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Odyssey CLx-System. Anhand der Immunoblots erfolgte die densitometrische Analyse, die im Balkendiagramm als Mittelwert ± SD abgebildet ist (HCC-44: 48 h: n=5; 96 h: n=2-3; 144 h: n=2-4; H23: 48 h: n=1; 96 h: n=2, 144 h: n=3).

Da die HCC-44- (Abb. 21 A) und H23-Zellen (Abb. 21 B) das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin exprimieren (K. Giehl, persönliche Kommunikation; (32)), konnte die Expression dieses epithelialen Markerproteins analysiert werden. Hierbei zeigte sich bei 96 h bereits eine geringe Zunahme des E-Cadherin-Gehalts in MRTX849- ($1,37 \pm 0,14$ -fach; SD; n=3) und AMG510-inkubierten ($1,39 \pm 0,25$ -fach; SD; n=3) HCC-44-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Deutlicher war die Zunahme des E-Cadherin-Gehalts für die AMG510-inkubierten HCC-44-Zellen bei 144 h mit einem Anstieg auf das $1,52 \pm 0,18$ -fache (SD; n=4) der DMSO-Kontrolle. In H23-Zellen ließen sich im Mittel allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung keine klaren Tendenzen für den E-Cadherin-Gehalt in den durchgeführten Versuchen erkennen.

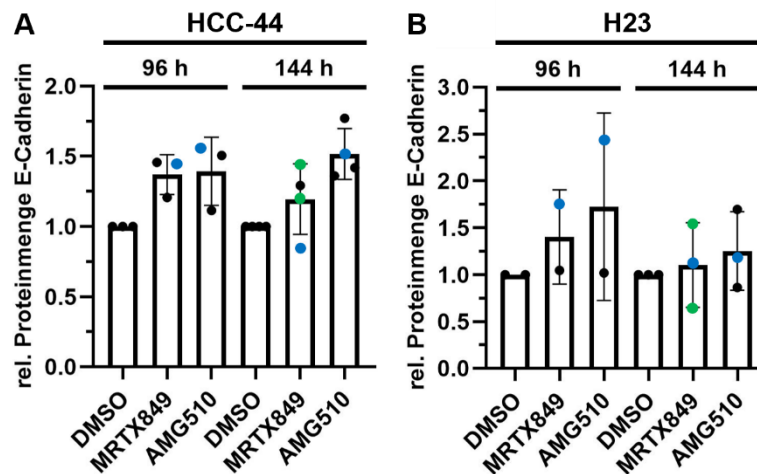


Abb. 21 A, B: E-Cadherin-Proteinexpression nach Behandlung von HCC-44- (A) und H23-Zellen (B) mit MRTX849 und AMG510. Die Zellen wurden mit MRTX849 bzw. AMG510 und zur Kontrolle mit DMSO für 48 h, 96 h und 144 h in Kulturmedium behandelt. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind anhand blauer (alle 24 h Wechsel von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 und 1 nM MRTX849 bzw. 2 nM AMG510), grüner (10 nM MRTX849) oder schwarzer Punkte (20 nM MRTX849 bzw. AMG510) visualisiert. In einem SDS-Polyacrylamidgel wurden 50 µg Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von E-Cadherin sowie der Nachweis von GAPDH zur Beladungskontrolle erfolgte mit Protein-spezifischen Antikörper im Immunoblotverfahren im Odyssey CLx-System. Abgebildet sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse im Balkendiagramm als Mittelwert ± SD (HCC-44: n=3-4; H23: n=2-3).

Um erste Anhaltspunkte zum Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren über den längeren Zeitraum von 48 h bis 144 h auf weitere Zytoskelett-Proteine bzw. Zytoskelett-assoziierte Proteine zu erlangen, wurden Keratin, p120Catenin, β-Catenin und Paxillin im Immunoblotverfahren untersucht. In den MIA PaCa-2-Zellen (Abb. 22) trat eine Abnahme von p120Catenin und Paxillin über einen Zeitraum von 48 h bis 144 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach Behandlung mit MRTX849 auf, die sich in den AMG510-behandelten Zellen nicht so deutlich zeigte. In Anwesenheit von MRTX849 nahm im Vergleich zur Kontrolle der β-Catenin-Gehalt bei 48 h bis 144 h ab, was für AMG510 nur nach 48- und 96-stündiger Inkubationszeit beobachtet wurde. Die densitometrische Analyse ergab eine Abnahme des Keratin-Proteingehalts um ca. die Hälfte nach 144-stündiger MRTX849- ($0,52 \pm 0,18$ -fach; SD; n=2) und AMG510-Behandlung ($0,55 \pm 0,08$ -fach; SD; n=2) verglichen mit DMSO-Kontrollzellen.

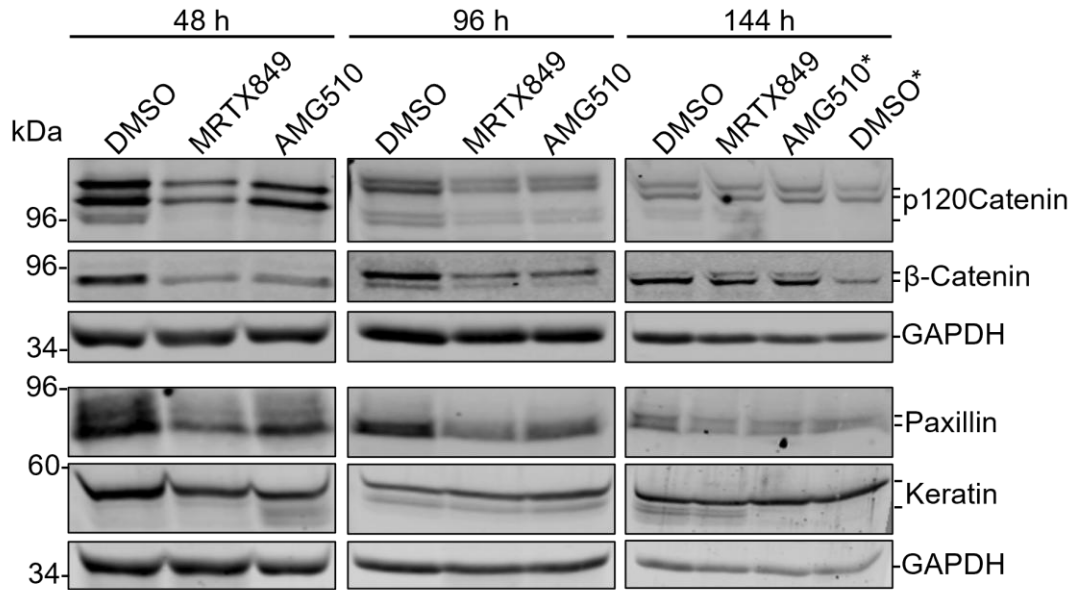


Abb. 22: Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition in MIA PaCa-2-Zellen auf die Proteinmenge von p120Catenin, β-Catenin, Paxillin und Keratin. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 48 h, 96 h, und 144 h in Kulturmedium mit 20 nM MRTX849 und 20 nM AMG510 inkubiert. DMSO-inkubierte Zellen dienen als Kontrolle. Pro Spur wurden 50 µg Proteinlysate in einem 8,5 %igen-, 10 %igen- oder 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von p120Catenin, β-Catenin, Paxillin und Keratin erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern und Immunoblotting im Odyssey CLx-System. Der Nachweis von GAPDH diente als Beladungskontrolle. Die mit *-markierte AMG510-Probe bezieht sich auf die mit *-markierte DMSO-Kontrolle (p120Catenin, β-Catenin: n=1; Paxillin, Keratin: 48 h, 144 h: n=2; 96 h: n=1).

Für die HCC-44-Zellen (Abb. 23) ergab die densitometrische Analyse, ähnlich wie für die MIA PaCa-2-Zellen, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine leichte Abnahme von p120Catenin nach MRTX849-Inkubation für 96 h bis 144 h. In Anwesenheit von AMG510 hingegen zeigte sich in den HCC-44-Zellen bei 144 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine leichte Zunahme des p120Catenin-Gehalts, die sich auch bei 144 h in den AMG510-inkubierten H23-Zellen zeigte. In H23-Zellen nahm der β-Catenin-Gehalt nach Inkubation mit AMG510 für 144 h auf das $1,51 \pm 0,09$ -fache (SD; n=2) der DMSO-Kontrolle zu. Weiterhin konnten keine signifikanten Veränderungen des β-Catenin-Proteingehalts in H23- und HCC-44-Zellen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

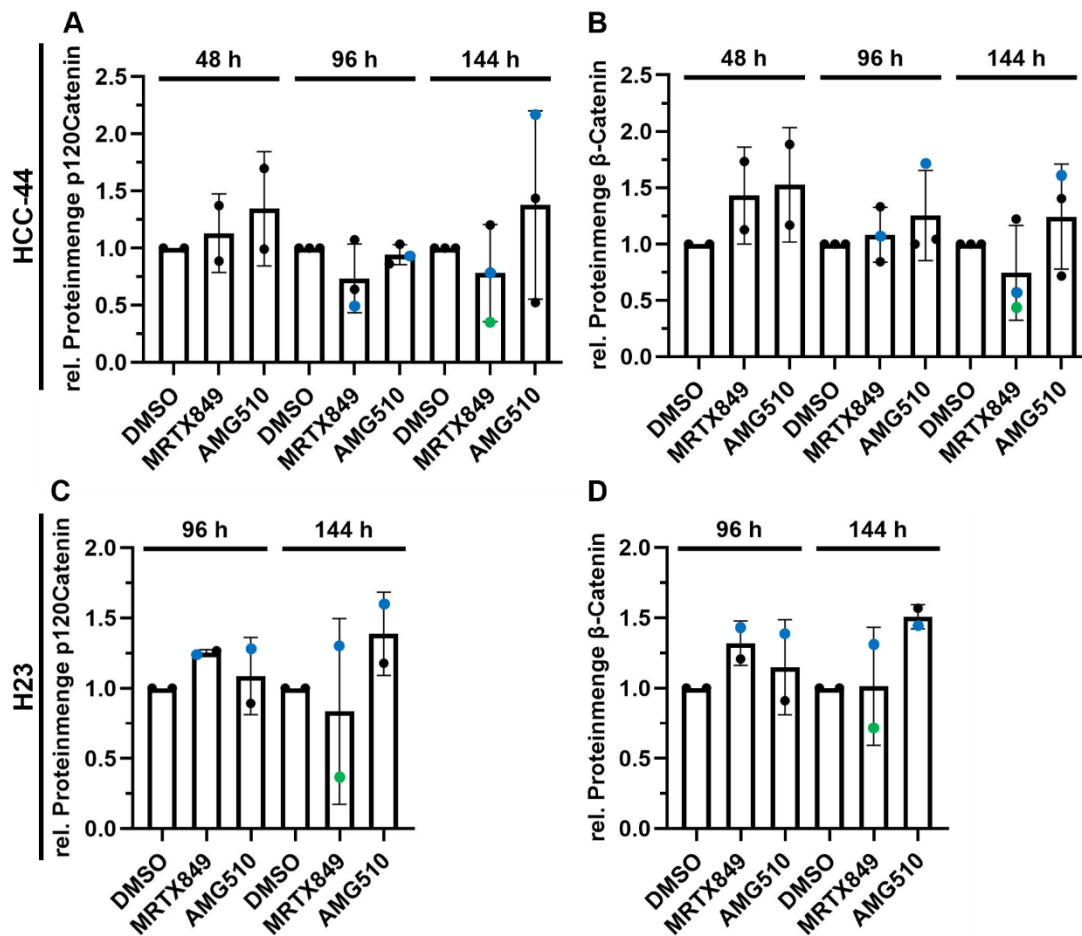


Abb. 23 A-D: Analyse der Menge von p120Catenin und β-Catenin in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44- (A, B) und H23-Zellen (C, D). Die Zellen wurden mit MRTX849 und AMG510 für 48 h, 96 h und 144 h in Kulturmedium behandelt. Die verwendeten Konzentrationen sind anhand blauer (alle 24 h Wechsel von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 und 1 nM MRTX849 bzw. 2 nM AMG510), grüner (10 nM MRTX849) oder schwarzer Punkte (20 nM MRTX849 bzw. AMG510) markiert. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle. In einem SDS-Polyacrylamidgel wurden 50 µg Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von p120Catenin und β-Catenin erfolgte mit Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren im Odyssey CLx-System. Abgebildet sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse im Balkendiagramm als Mittelwert ± SD (HCC-44: n=2-3; H23: n=2).

Wie bereits bei der Kurzinkubation der MIA PaCa-2-Zellen für 16 h, konnte auch für die Inkubationszeiten von 48 h bis 144 h die Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren in MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen bestätigt werden, da sich in MRTX849- und AMG510 inkubierten Zellen aller drei Zelllinien eine Abnahme des Gehalts an pERK1/2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte (siehe Abb. 24). Hierbei war in den MIA PaCa-2-Zellen die Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung bei 144 h geringer als nach den kürzeren Inkubationszeiten von 48 h und 96 h.

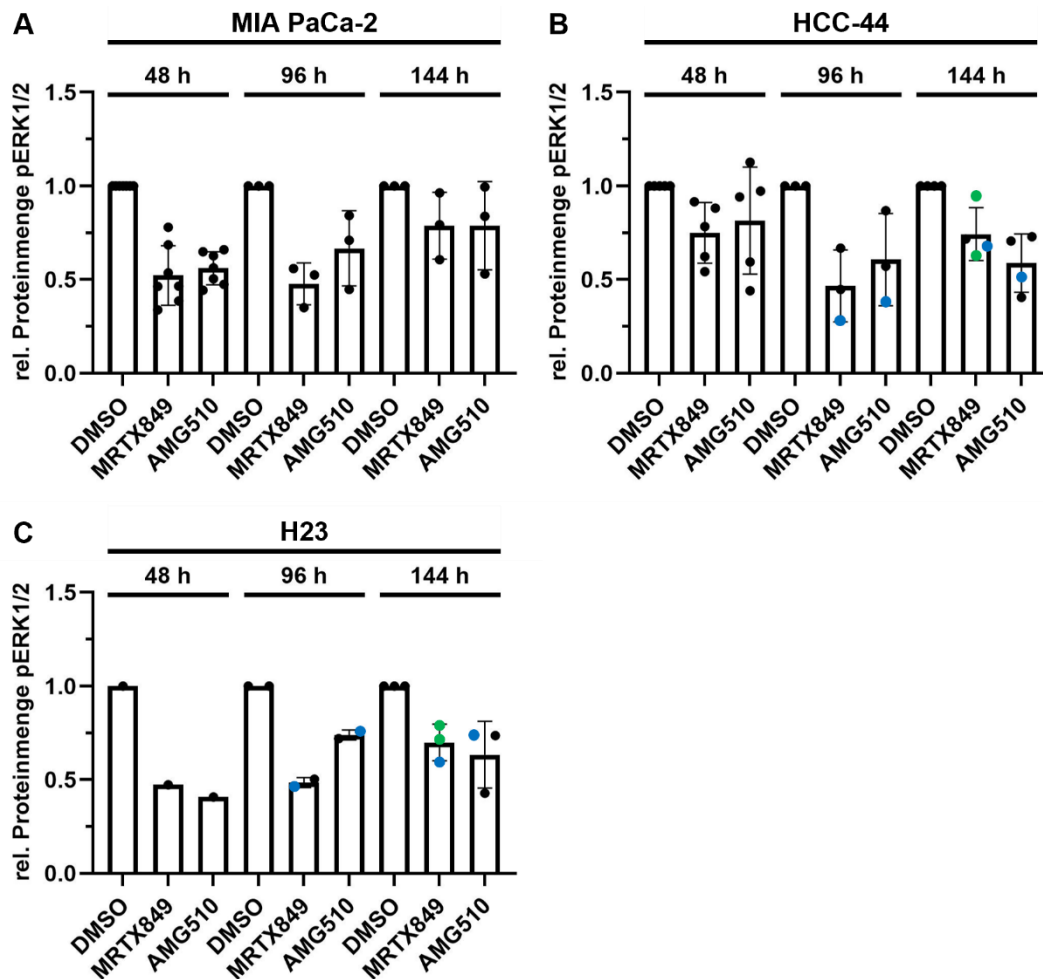


Abb. 24 A-C: Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2- (A), HCC-44- (B) und H23-Zellen (C). Die Zellen wurden mit MRTX849 und AMG510 für 48 h, 96 h und 144 h in Kulturmedium inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen sind anhand blauer (alle 24 h Wechsel von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 und 1 nM MRTX849 bzw. 2 nM AMG510), grüner (10 nM MRTX849) oder schwarzer Punkte (20 nM MRTX849 bzw. AMG510) visualisiert. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. 50 µg Proteinlysate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von pERK1/2 sowie der GAPDH-Beladungskontrolle erfolgte mittels Protein- bzw. phospho-Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren im Odyssey CLx-System. Abgebildet sind die Ergebnisse der densitometrischen Analyse im Balkendiagramm als Mittelwert ± SD (MIA PaCa-2: n=3-7; HCC-44: n=3-5; H23: n=1-3).

Anhand der abgebildeten Daten lässt sich zusammenfassen, dass vor allem nach AMG510-Behandlung der Vimentin-Proteingehalt bei 48 h abnahm, nach den längeren Inkubationszeiten bis 144 h allerdings bei beiden Inhibitoren tendenziell anstieg. Hingegen nahm die Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 sowohl in MRTX849- als auch in AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen bei allen untersuchten Zeiträumen ab. Jedoch wurde bei 144 h in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen eine leichte Zunahme von pVimSer38 gemessen, was auf Zelltyp-spezifische und zeitabhängige Effekte der K-Ras G12C-Inhibitoren hindeutet. Für das epitheliale Markerprotein E-Cadherin wurde vor allem bei den HCC-44-Zellen eine moderate Zunahme detektiert. Eindeutige Veränderungen des Keratin-Proteingehalts wurden weder in MRTX849- noch in AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen gemessen.

3.2.4 Expression des Vimentin-Gens in MIA PaCa-2-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition

Da im Immunoblotverfahren für MIA PaCa-2-Zellen Veränderungen des Vimentin-Proteingehalts nach Behandlung mit MRTX849 und AMG510 detektiert wurden (siehe Kapitel 3.2.3), wurde mittels qRT-PCR der Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf die Genexpression von *Vimentin* in MIA PaCa-2 Zellen untersucht.

MIA PaCa-2 Zellen wurden in Kulturmedium für 48 h, 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 und zur Kontrolle mit DMSO inkubiert. Es erfolgte alle 24 h ein Wechsel des Kulturmediums und eine erneute Zugabe der K-Ras G12C-Inhibitoren oder DMSO. Die Herstellung der RNA aus konfluent gewachsenen Zellen und das Umschreiben in cDNA wurde von Mitarbeitern der AG Prof. Dr. K. Giehl durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode. In Abb. 25 ist die relative Expression des Vimentin-Gens im Balkendiagramm als Mittelwert \pm SD, bezogen auf die Expression des Haushaltsgens *RPLP0*, dargestellt.

Die relative Expression des Vimentin-Gens war in den MRTX849-behandelten MIA PaCa-2-Zellen bei 48 h auf das 0,42-fache ($n=1$) und bei 144 h auf das $0,59 \pm 0,16$ -fache (SD; $n=3$) der DMSO-Kontrolle vermindert. Nach der 96-stündigen Inkubationszeit wurde in MRTX849-behandelten Zellen allerdings nur eine sehr geringfügige Abnahme auf das $0,90 \pm 0,26$ -fache (SD; $n=3$) der DMSO-Kontrolle detektiert. Die Behandlung der Zellen mit AMG510 für 48 h führte zu einer Verminderung der Expression von *Vimentin* auf das 0,50-fache ($n=1$) der DMSO-Kontrolle. Nach den längeren Inkubationszeiten wurde in AMG510-behandelten Zellen bei 96 h jedoch keine Veränderung ($1,18 \pm 0,59$ -fach; SD; $n=3$) und bei 144 h mit $1,65 \pm 1,01$ -fach (SD, $n=3$) möglicherweise eine Zunahme der Vimentin-Genexpression gemessen (siehe Abb. 25). Da die Differenzen der Einzelmessungen sehr hoch sind, kann keine abschließende Aussage getroffen werden.

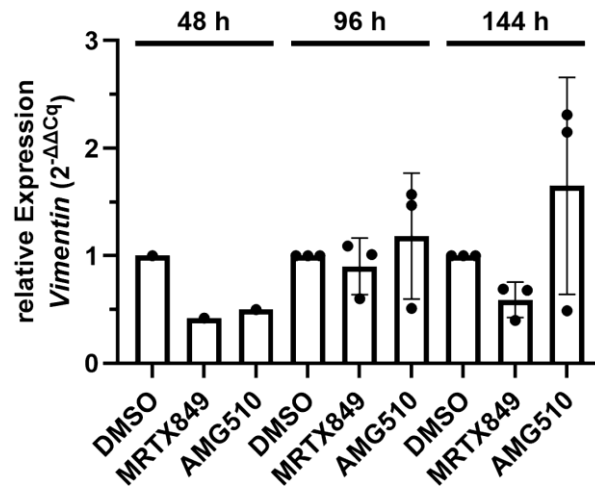


Abb. 25: Veränderungen der Expression des Vimentin-Gens in MIA PaCa-2-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition. Mittels RT-qPCR wurde die Expression des Vimentin-Gens in MIA PaCa-2-Zellen nach Behandlung mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 für 48 h, 96 h und 144 h untersucht. Der Nachweis von *Vimentin* und des Haushaltsgens *RPLP0* erfolgte mit spezifischen Primern. Mit der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode wurde die relative Genexpression von *Vimentin* ermittelt, wobei *RPLP0* als Referenzgen diente. Angegeben ist die relative Genexpression als Mittelwert \pm SD (48 h: n=1; 96 h, 144 h: n=3).

3.2.5 Analyse des Einflusses von MRTX849 und AMG510 auf Vimentin mittels Tritonfraktionierung

Zur Analyse der Verankerung von Proteinen an Membranen und am Zytoskelett wurde die Tritonfraktionierung durchgeführt. Es wurde vor allem der Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Verteilung von Vimentin in Vimentinfilamenten oder als lösliches Vimentin untersucht.

Hierfür wurden MIA PaCa-2- und HCC-44- und H23-Zellen mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 für 48 h in Kulturmedium inkubiert, mit einem Wechsel des Kulturmediums inklusive Inhibitorzugabe nach 24 h. Die Zellen wurden in Tritonpuffer lysiert und die löslichen und unlöslichen Proteine mittels Zentrifugation voneinander separiert. Die tritonunlösliche Fraktion enthält Proteine, welche am Zytoskelett oder an Membranen gebunden sind. Die tritonlösliche Fraktion enthält Proteine, welche nicht am Zytoskelett oder an Membranen verankert sind. Der Nachweis der Proteine bzw. Proteinmengen erfolgte mittels Immunoblotting mit Protein- bzw. phospho-Protein-spezifischen Antikörpern im Odyssey CLx-System. Die Proteinbanden wurden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben densitometrisch analysiert. Die vollständigen Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind Tabelle 19 im Anhang zu entnehmen.

Die Inkubation mit MRTX849 und AMG510 führte in den MIA PaCa-2- (Abb. 26 A) und HCC-44-Zellen (Abb. 26 C) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einer tendenziellen Abnahme von pVimSer38 sowohl in der tritonlöslichen Fraktion als auch in der

tritonunlöslichen Fraktion, wobei der Nachweis von pVimSer38 in den HCC-44-Zellen in der tritonlöslichen Fraktion nur einmalig gelang. Für die H23-Zellen (Abb. 26 B) wurde im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme des pVimSer38-Gehalts nach MRTX849- und AMG510-Behandlung in der tritonlöslichen Fraktion gemessen, welche auch in der tritonunlöslichen Fraktion nach AMG510-, nicht aber nach MRTX849-Behandlung auftrat. Eindeutige Veränderungen des löslichen und unlöslichen Vimentin-Proteingehalts hingegen konnten in Zellen aller drei Zelllinien weder nach MRTX849- noch AMG510-Behandlung im Vergleich zu DMSO-inkubierten Zellen beobachtet werden. Anhand der Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 in den MRTX849- und AMG510-inkubierten Zellen in der tritonlöslichen und tritonunlöslichen Fraktion, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, konnte in den MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen die Wirkung der K-Ras G12C-Inhibitoren bestätigt werden. Um erste Hinweise auf die Verteilung von p120Catenin und β -Catenin in den HCC-44-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition zu erlangen, wurden diese Proteine einmalig untersucht, wobei sich keine Veränderungen im Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle zeigten.

Da sich in der Tritonfraktionierung keine eindeutigen Veränderungen des Vimentin-Proteingehalts, weder in den MIA PaCa-2-, noch in HCC-44- oder H23-Zellen zeigten, wurde die Wirkung der K-Ras G12C-Inhibition auf Vimentinfilamente und andere Bestandteile des Zytoskeletts im Immunfluoreszenzverfahren untersucht. Hierdurch konnten neben den Gesamtzellysat-Analysen, die bei der Tritonfraktionierung und im Immunoblotverfahren genutzt wurden, Veränderungen in Einzelzell-Analysen beobachtet werden.

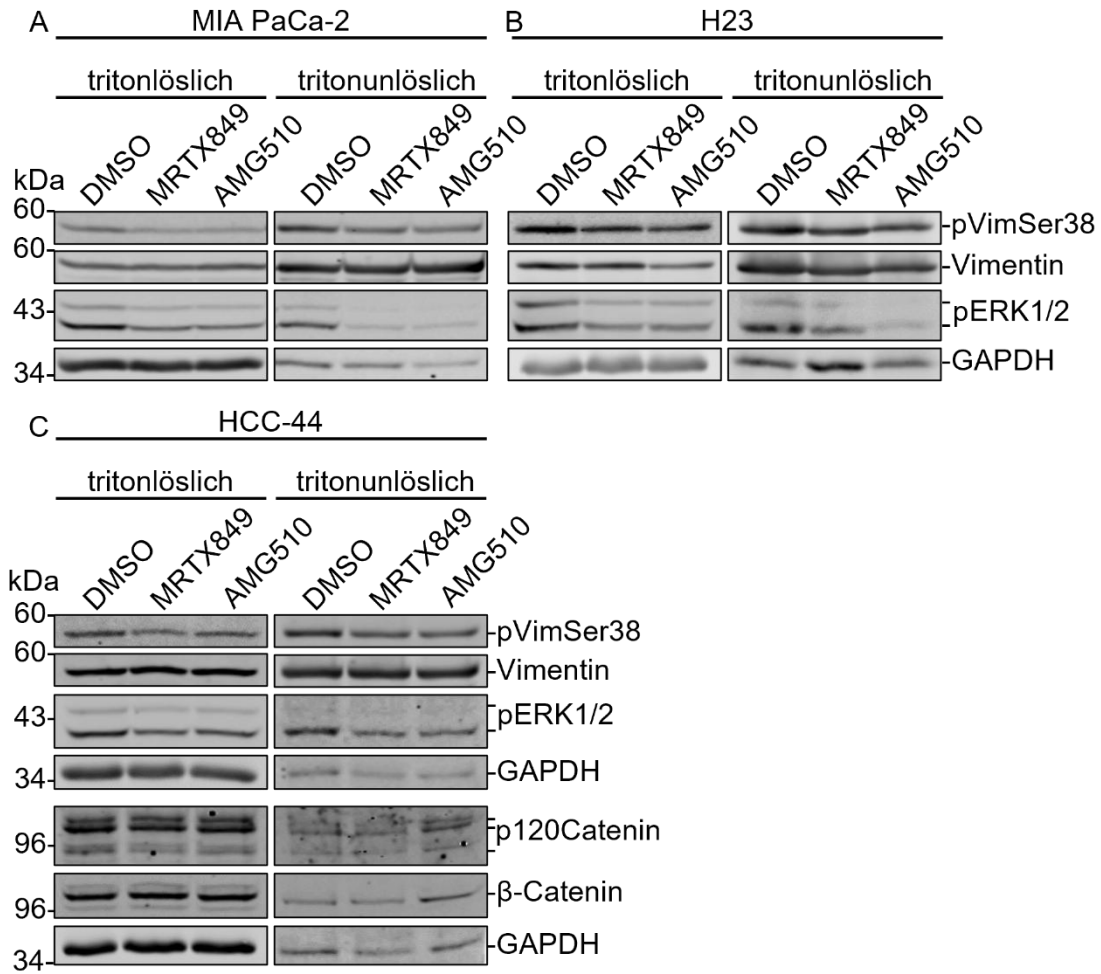


Abb. 26: Wirkung von MRTX849 und AMG510 auf die Verteilung von pVimSer38, Vimentin, pERK1/2 p120Catenin und β-Catenin nach Tritonfraktionierung in MIA PaCa-2- (A), H23- (B) und HCC-44-Zellen (C). Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit 20 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 in Kulturmedium inkubiert. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle. In einem 10 %-igem SDS-Gel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von 50 µg Proteinlysate. Die Proteine wurden mit Protein- und phospho-Protein-spezifischen Antikörpern im Immunoblotverfahren im OdysseyCLx-System nachgewiesen. Der Nachweis von GAPDH diente als Beladungskontrolle. Abgebildet sind repräsentative Blots (MIA PaCa-2: n=3; HCC-44: n=1-3; H23: n=2).

3.3 Analyse des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibition auf das Zytoskelett in MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen

Nach der Analyse der Proteinexpression von Vimentin und Zytoskelett-assoziierten Proteinen in Gesamtzelllysat-Analysen wurde nun mittels Immunfluoreszenzverfahren der Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf Vimentin in Einzell-Analysen der HCC-44-, H23- und MIA PaCa-2-Zellen untersucht. Weiterhin wurden auch das Intermediärfilament Keratin und filamentöses Aktin untersucht, da bereits gezeigt werden konnte, dass mutiertes K-Ras das Aktin- und Keratinzytoskelett beeinflusst (27). Neben dem Aktinzytoskelett wurden auch die Aktin-assoziierten Proteine Vinkulin und Palladin analysiert. Vinkulin befindet sich als Adapterprotein in Fokalkontakten und dient der Verankerung des Aktinzytoskeletts mit der extrazellulären Matrix (95). Palladin führt zur Quervernetzung von Aktinfilamenten (24). Außerdem wurden aufgrund von festgestellten Veränderungen des Aktinzytoskeletts in den Inhibitor-behandelten Zellen auch β -Catenin und Paxillin untersucht. Paxillin liegt neben Vinkulin in Fokalkontakten vor (95). β -Catenin ist für die Ausbildung von Cadherin-haltigen Zell-Zellkontakten notwendig, in denen es über α -Catenin die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellt (37, 119). Zudem kann es nach Translokation in den Zellkern Transkriptionsfaktoren regulieren (135).

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 (Immunoblotanalysen) beschrieben, wurden die HCC-44-Zellen für die Immunfluoreszenz zunächst mit 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 für 96 h inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte mit 1/10 der ursprünglichen Konzentration nach 24 h und der einfachen Konzentration nach 48 h und 72 h Inkubationszeit. Repräsentative Aufnahmen zur Organisation des Vimentin- und Aktinzytoskeletts dieser Untersuchung sind in Abb. 39 im Anhang dargestellt. Da HCC-44-Zellen die Behandlung mit dieser InhibitorKonzentration ohne augenscheinliche morphologische Beeinträchtigung überlebten, erfolgte eine Erhöhung der InhibitorKonzentration auf die bei den Immunoblots verwendete Dosis. Diese entsprach für die HCC-44- und H23-Zellen 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 für 96 h und 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 für 144 h. Die MIA PaCa-2-Zellen wurden mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 behandelt. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 24 h. Abb. 27-29 zeigen Aufnahmen der Vimentin- und Keratinfilamente, Abb. 30-36 zeigen Aufnahmen der Aktinfilamente, Vinkulin, Palladin, β -Catenin und Paxillin. Der Nachweis von filamentösem Aktin erfolgte mit Phalloidin, gekoppelt an Alexa488. Die Darstellung der übrigen Proteine erfolgte jeweils mit spezifischen Primärantikörpern und Cy3-gekoppelten (Vimentin, Vinkulin, Paxillin) oder Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpern (Palladin, β -Catenin). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

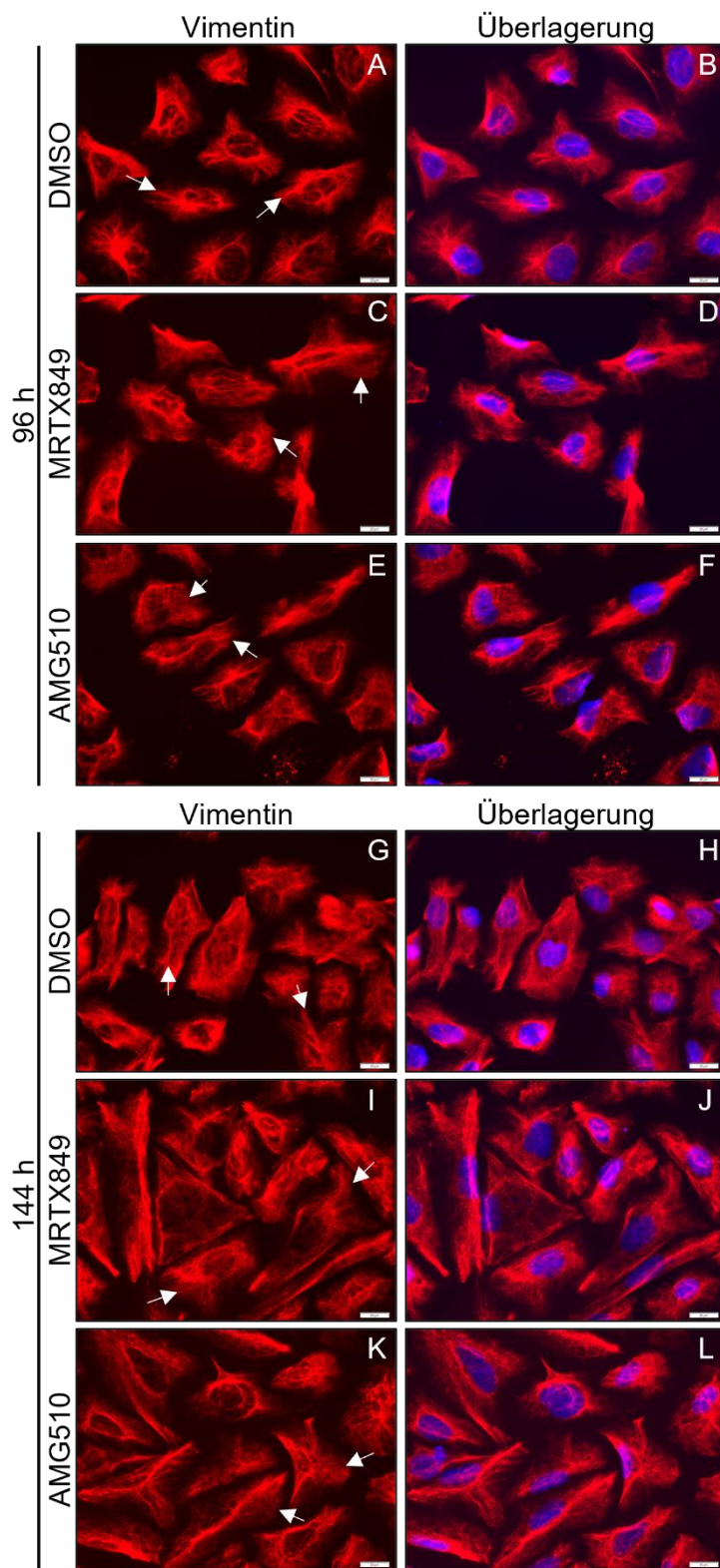


Abb. 27: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf Vimentinfilamente in HCC-44-Zellen. Die Zellen wurden für 96 h mit 20 nM MRTX849 (C, D) bzw. AMG510 (E, F) und für 144 h mit 10 nM MRTX849 (I, J) und 20 nM AMG510 (K, L) in Kulturmedium inkubiert. Als Kontrolle dienten DMSO-inkubierte Zellen (96 h: A, B; 144 h: G, H). Der Nachweis von Vimentin erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Abgebildet sind ausgewählte Bilder aus 5-6 Aufnahmen je durchgeführtem Versuch (96 h: n=1; 144 h: n=3). Maßstabbalken: 20 µm.

Die HCC-44-Kontrollzellen zeigten ein dichtes und gleichmäßig im Zytoplasma verteiltes Vimentinfilament-System mit langen faserartigen Filamenten und dicken Vimentinfilament-Bündeln (Pfeile in Abb. 27 A, G). Nach 96- und 144-stündiger MRTX849- und AMG510-Behandlung der HCC-44-Zellen wiesen diese Zellen ebenfalls ein dichtes Vimentinfilament-System auf, welches jedoch, vor allem nach 144-stündiger Inhibitor-Behandlung, nur noch wenige lange, faserartige oder dicke Filamente zeigte. Hierbei zeigten sich zudem Bereiche mit diffuser Verteilung von Vimentin (weiße Pfeile in Abb. 27 C, E, I, K), was auf einen Abbau oder eine Umverteilung der Filamente hindeutet. Dies konnte auch in der initialen Analyse der HCC-44-Zellen festgestellt werden, bei der teils 1/10 der ursprünglichen Inhibitor-Konzentration verwendet wurde (siehe Abb. 39 im Anhang).

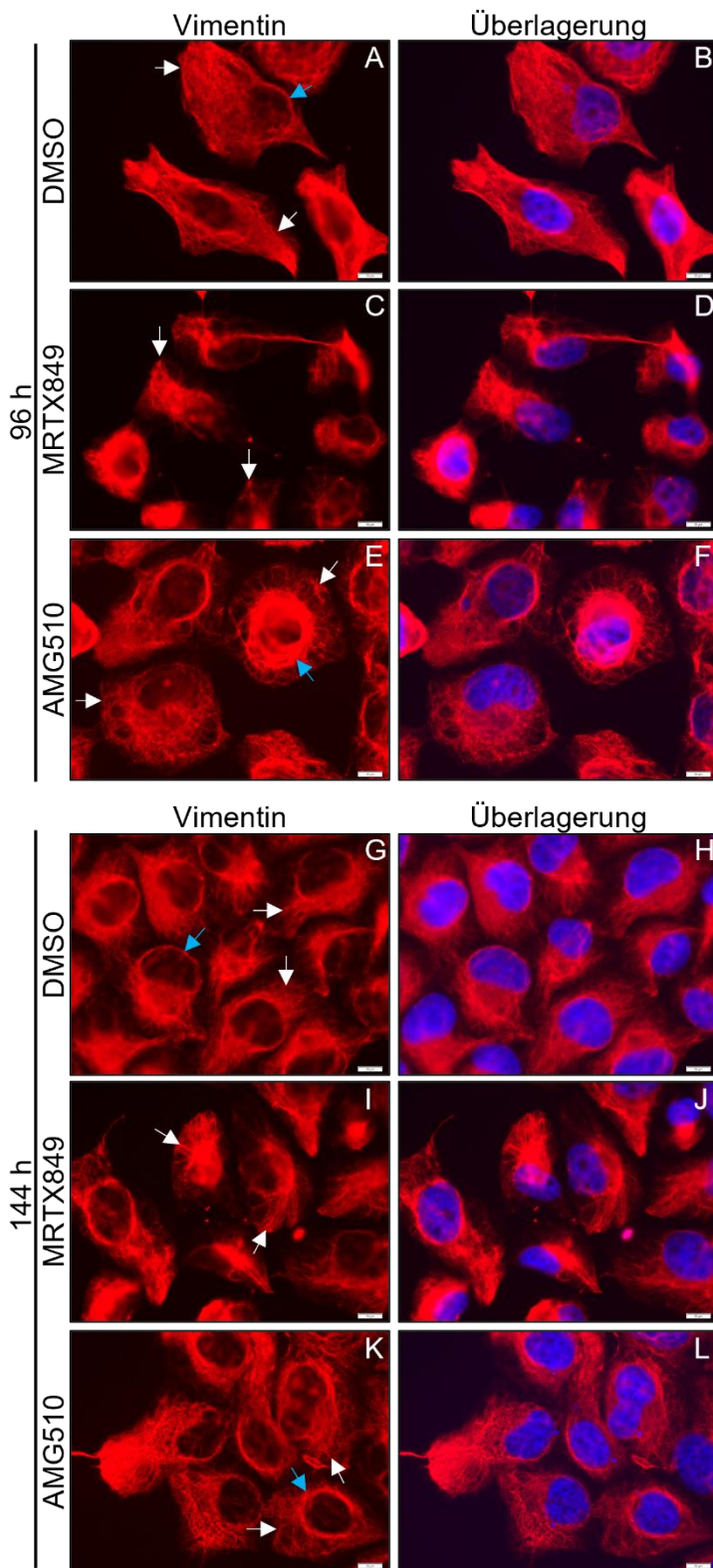


Abb. 28: MRTX849 und AMG510 beeinflussen Vimentinfilamente in H23-Zellen. Für 96 h wurden H23-Zellen mit 20 nM MRTX849 (C, D) bzw. AMG510 (E, F) und für 144 h mit 10 nM MRTX849 (I, J) und 20 nM AMG510 (K, L) in Kulturmedium inkubiert. Als Kontrolle dienten DMSO-inkubierte Zellen (96 h: A, B; 144 h: G, H). Verwendet wurde DAPI für die Kernfärbung und ein Vimentin-Primärantikörper und ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper. Je durchgeführtem Versuch wurden 3-4 Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 aufgenommen, von denen ausgewählte Aufnahmen abgebildet sind (96 h: n=1; 144 h: n=2). Maßstabbalken: 10 μ m.

Ebenso wie die HCC-44-Kontrollzellen wiesen auch die H23-Kontrollzellen ein feines, dichtes und gleichmäßig in der Zelle verteiltes Vimentinfilament-System auf (weiße Pfeile in Abb. 28 A, G).

Kompakte Vimentinfilament-Bündel fanden sich in den DMSO-behandelten H23-Zellen nicht. Nach 96-stündiger und noch deutlicher nach 144-stündiger MRTX849-Behandlung bildeten die H23-Zellen ausgeprägtere

Vimentinfilament-Bündel (weiße Pfeile in Abb. 28 C, I) als die H23-Kontrollzellen. Die Behandlung mit AMG510 führte ebenfalls zur Ausbildung von dichten Vimentinfilamenten (weiße Pfeile in Abb. 28 E, K), die jedoch feiner waren als in den MRTX849-behandelten Zellen. Zudem zeigten insbesondere die AMG510-behandelten H23-Zellen dichte ringförmige Vimentinstrukturen um den Zellkern (blaue Pfeile in Abb. 28 E, K), was in den Kontrollzellen kaum ausgeprägt war (blaue Pfeile in Abb. 28 A, G).

Den deutlichsten Umbau der Vimentinfilamente nach MRTX849- und AMG510-Behandlung zeigten die MIA PaCa-2-Zellen (Abb. 29). Diese Zellen bildeten in Anwesenheit von MRTX849 und AMG510 dicke Vimentinfilamentbündel (Pfeile in Abb. 29 C, E, J, M), die nach 144-stündiger Inkubation am ausgeprägtesten waren (Pfeile in Abb. 29 J, M). Hingegen bildeten die DMSO-behandelten MIA PaCa-2-Zellen feinere Vimentinfilamente (Pfeile in Abb. 29 A, G). In MIA PaCa-2-Zellen wurde bei 144 h auch das Keratinfilamentsystem untersucht (Abb. 29 G-O). Hierbei wurde in den Kontrollzellen eine diffuse Verteilung von Keratin beobachtet (Pfeile in Abb. 29 H), während MRTX849- und AMG510-behandelte MIA PaCa-2-Zellen kompaktere Keratinfilamente ausbildeten (Pfeile in Abb. 29 K, N). Das Vorliegen von Vimentin- und Keratinfilamenten in gleichen zellulären Bereichen in den Inhibitor-behandelten Zellen wird anhand einer Gelbfärbung in der Überlagerung beider Kanäle (roter Kanal: Vimentin; grüner Kanal: Keratin) in Abb. 29 sichtbar (Pfeile in Abb. 29 L, O). Auch in den DMSO-Kontrollzellen deutete eine Gelbfärbung das Vorliegen von Keratin und Vimentin in den gleichen zellulären Bereichen an (Pfeile in Abb. 29 I).

Aus den dargestellten Immunfluoreszenzaufnahmen lässt sich zusammenfassen, dass beide K-Ras G12C-Inhibitoren das Vimentinfilamentsystem in Zellen aller drei untersuchten Zelllinien beeinflussen, wobei jedoch Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennbar wurden. Während die Behandlung mit MRTX849 und AMG510 in HCC-44-Zellen zum Abbau der Vimentinfilamente mit diffuser Verteilung von Vimentin führte, bildeten Inhibitor-behandelte H23- und MIA PaCa-2-Zellen kompaktere Vimentinfilamente. Besonders ausgeprägte Veränderungen des Vimentinfilament-Systems wurden hierbei in MIA PaCa-2-Zellen beobachtet, die zudem unter Inhibitor-Einfluss dicke Keratinfilamente ausbildeten.

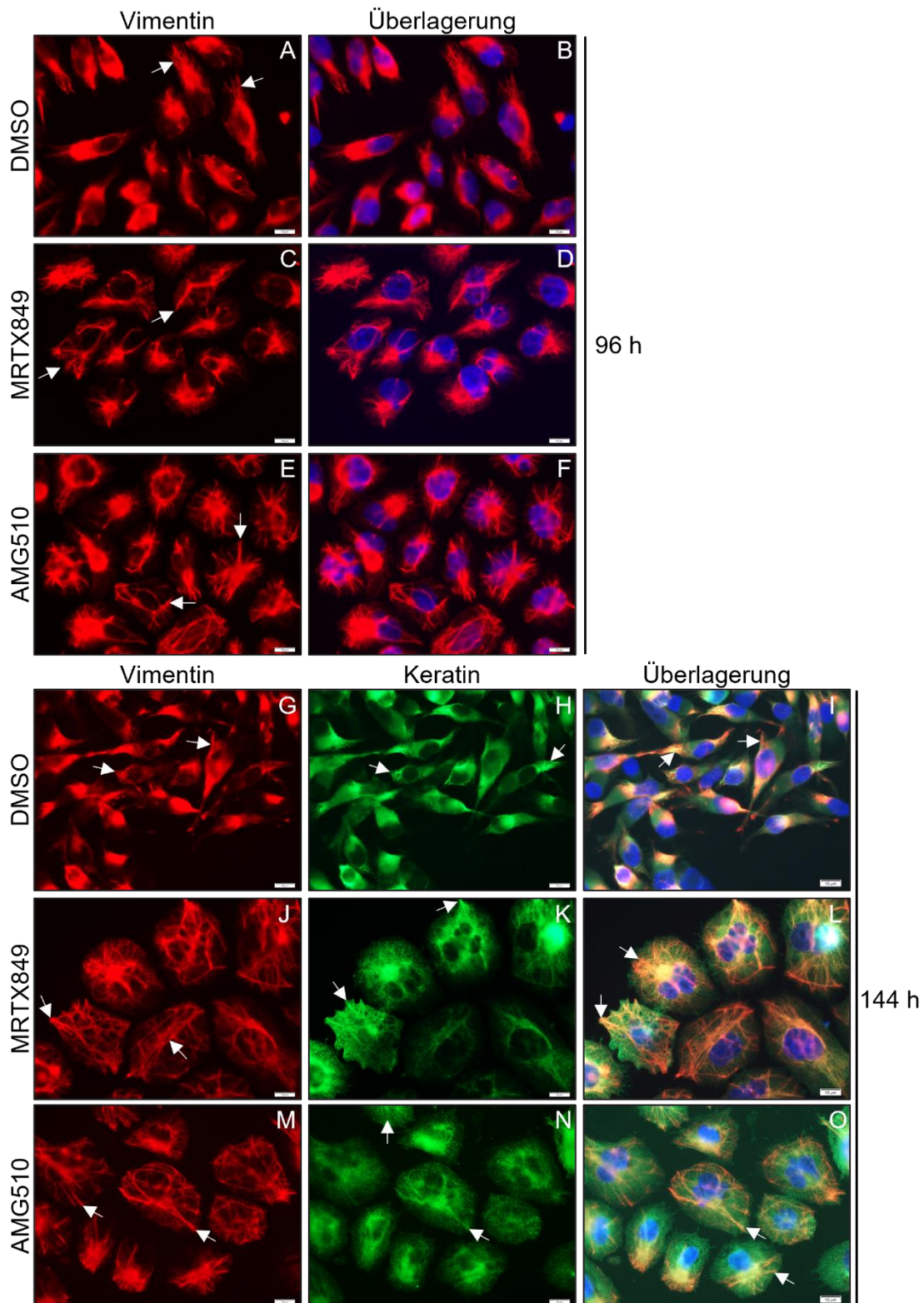


Abb. 29: Auswirkungen von MRTX849 und AMG510 auf Vimentin- und Keratinfilamente in MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 (96 h: C, D; 144 h: J-L) bzw. AMG510 (96 h: E, F; 144 h: M-O) in Kulturmedium inkubiert. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle (96 h: A, B; 144 h: G-I). Der Nachweis von Vimentin erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Für die Darstellung der Keratinfilamente wurde der panKeratin-Antikörper und ein Alexa488-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Es wurden 4-6 Aufnahmen je Versuchsansatz am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt, von denen ausgewählte Bilder abgebildet sind (Vimentin: n=2; Keratin: n=1). Der Maßstabbalken entspricht 10 µm.

Nachdem Veränderungen der Intermediärfilamente Vimentin und Keratin unter MRTX849- und AMG510-Einfluss beobachtet wurden, wurde der Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf die Aktinfilamente und die Aktin-assoziierten Proteine Vinkulin und Palladin untersucht. In den Untersuchungen des Aktinfilamentsystems mittels Phalloidin-Alexa488 (grüner Kanal) zeigte sich in den HCC-44-Zellen (Abb. 30) eine deutliche Ausbildung von Aktin-Stressfasern in Anwesenheit von MRTX849 und AMG510 bei 96 h und 144 h (Pfeile in Abb. 30 D, G, M, P und Abb. 39 G, J, M, P), verglichen mit den feinen Aktinfilamenten der DMSO-Kontrollzellen (Pfeile in Abb. 30 A, J und Abb. 39 A, D). Vinkulin-haltige Fokalkontakte (roter Kanal) wurden durch Verwendung eines spezifischen anti-Vinkulin-Primärantikörpers und eines an Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. In der Überlagerung des roten (Vinkulin) und grünen Kanals (F-Aktin/Phalloidin) ist zu erkennen, dass sowohl nach MRTX849- als auch nach AMG510- und DMSO-Behandlung die Stressfasern in Vinkulin-haltigen Fokalkontakten enden (Pfeile in Abb. 30 C, F, I, L, O, R). Vinkulin war in den HCC-44-Kontrollzellen vor allem perinukleär im Zytoplasma lokalisiert. In den Inhibitor-behandelten HCC-44-Zellen hingegen war Vinkulin sowohl bei 96 h als auch bei 144 h verstärkt in fokalen Kontakten in der Zellperipherie zu finden (Pfeile in Abb. 30 E, H, N, O und Abb. 31 E, H), die in den Inhibitor-behandelten Zellen in deutlich höherer Anzahl ausgebildet wurden, was durch Quantifizierung bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 3.4). In Abb. 30 lässt sich außerdem gut erkennen, dass in Anwesenheit der Inhibitoren die HCC-44-Zellen rundlicher imponieren und größer erscheinen als die DMSO-Kontrollzellen, was bereits in Phasenkontrastaufnahmen (Kapitel 3.2.2) detektiert wurde. Die Größenzunahme wurde durch Ausmessen der Zellfläche näher untersucht (siehe Kapitel 3.4).

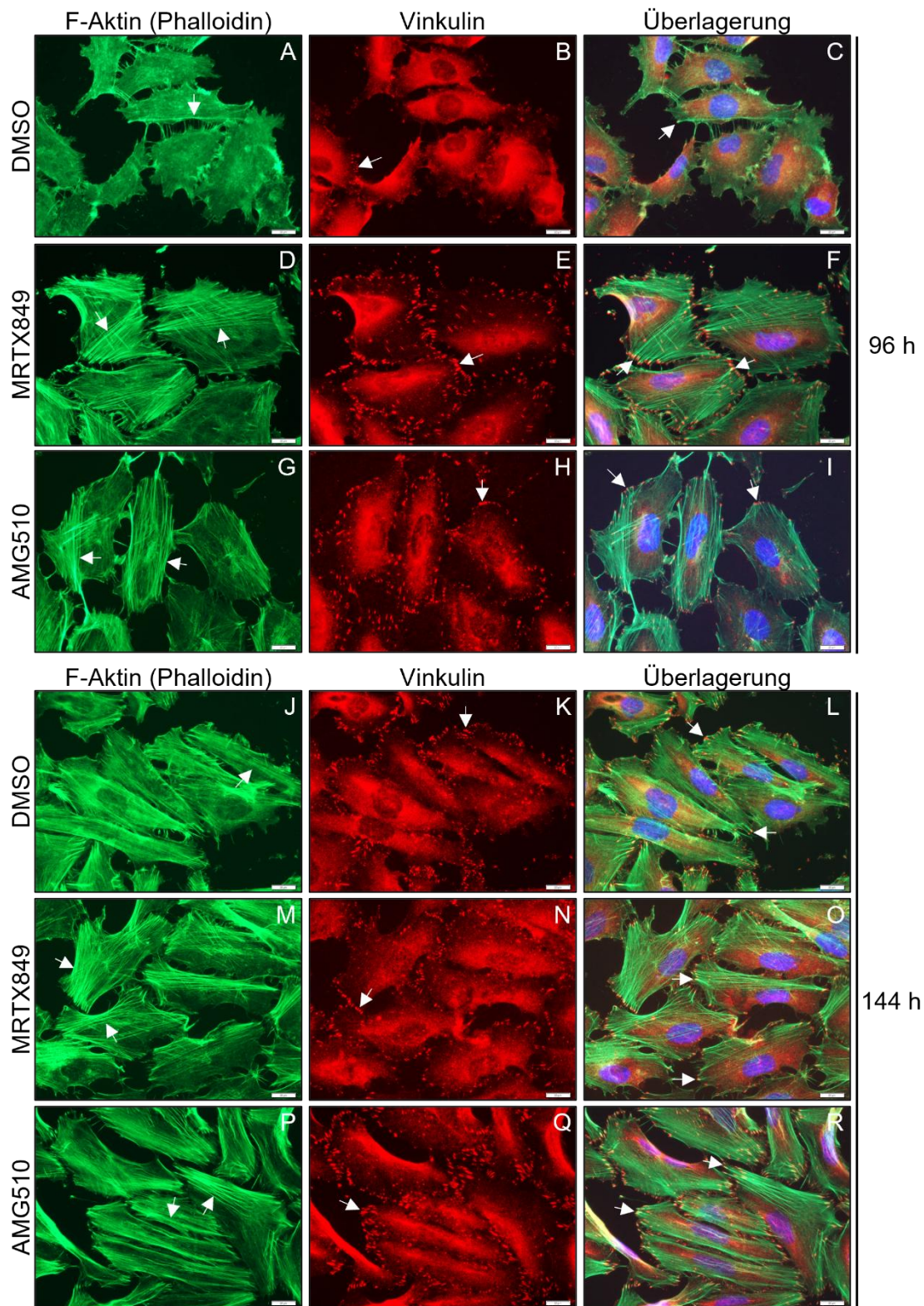


Abb. 30: Das Aktin-Zytoskelett und die Verteilung von Vinculin in HCC-44-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition. HCC-44-Zellen wurden für 96 h mit 20 nM MRTX849 (D-F) bzw. AMG510 (G-I) und für 144 h mit 10 nM MRTX849 (M-O) und 20 nM AMG510 (P-R) in Kulturmedium inkubiert. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen (96 h: A-C; 144 h: J-L). Der Nachweis von F-Aktin erfolgte mit Phalloidin-Alexa488. Der Nachweis von Vinculin gelang mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt. Der Maßstababalken entspricht 20 μm . Abgebildet ist sind ausgewählte Aufnahmen aus 3-5 repräsentativen Bildern je durchgeführtem Versuch (96 h n=1; 144 h n=3).

In der Analyse der Verteilung von Palladin, welches der Quervernetzung von Aktinfilamenten dient (24), wurden in HCC-44-Kontrollzellen bei 144 h streifenförmige Anlagerungen von Palladin in der Zellperipherie detektiert (Pfeile in Abb. 31 A). In MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen stellten sich diese Palladin-Anlagerungen verglichen mit den DMSO-Kontrollzellen verlängert dar, sodass sie an Aktinfilamente erinnern (Pfeile in Abb. 31 D, G). In der Überlagerung des grünen und roten Kanals ist erkennbar, dass die streifigen Ansammlungen von Palladin in der Zellperipherie in Vinkulin-haltigen fokalen Kontakten enden. Dies konnte sowohl in DMSO-behandelten HCC-44-Zellen (Pfeile in Abb. 31 C) als auch in Inhibitor-behandelten HCC-44-Zellen detektiert werden (Pfeile in Abb. 31 F, I).

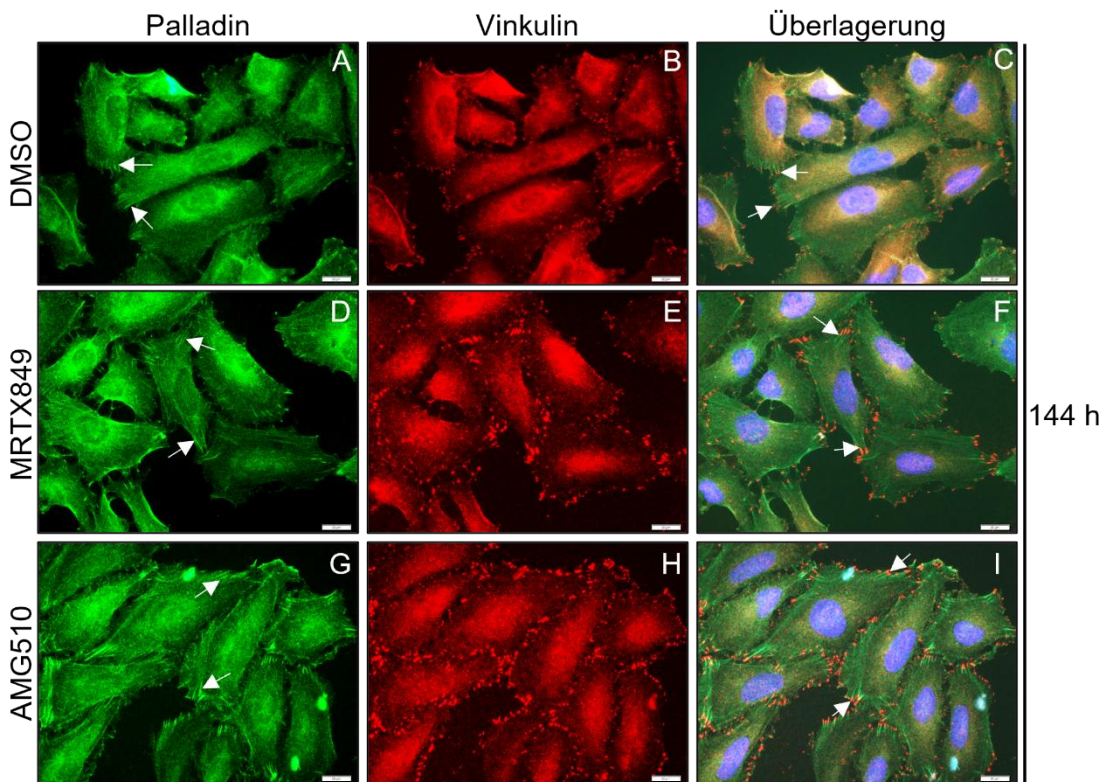


Abb. 31: Die Verteilung von Palladin und Vinkulin in HCC-44-Zellen nach K-Ras G12C-Inhibition. Die Inkubation der HCC-44-Zellen erfolgte für 144 h mit 10 nM MRTX849 (D-F) und 20 nM AMG510 (G-I) in Kulturmedium. Zur Kontrolle wurden Zellen mit DMSO inkubiert (A-C). Die Detektion von Vinkulin und Palladin erfolgte jeweils mit spezifischen Primärantikörpern und einem Cy3-gekoppelten (Vinkulin) bzw. Alexa488-gekoppelten (Palladin) Sekundärantikörper. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Abgebildet sind ausgewählte Bilder aus 5-7 repräsentativen Aufnahmen je durchgeführtem Versuch (Palladin: n=1; Vinkulin: n=3), welche am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt wurden. Maßstabballen: 20 μ m.

Ebenso wie in den HCC-44-Zellen führten MRTX849 und AMG510 auch in den H23-Zellen zu einer deutlichen Zunahme der Aktin-Stressfasern (weiße Pfeile in Abb. 32 D, G, M, P) verglichen mit den feinen Aktinfilamenten der DMSO-inkubierten H23-Zellen (Pfeile in Abb. 32 A, J). In MRTX849- und AMG510-inkubierten H23-Zellen wurde zudem

mehr kortikales Aktin beobachtet (blaue Pfeile in Abb. 32 D, G, M, P) als in den DMSO-Kontrollzellen (siehe Abb. 32 A, J). In der Überlagerung des grünen (F-Aktin) und roten Kanals (Vinkulin) ist erkennbar, dass die Aktin-Stressfasern der Inhibitor-behandelten H23-Zellen deutlich häufiger in Vinkulin-haltigen Fokalkontakten enden (weiße Pfeile in Abb. 32 F, I, O, R) als in DMSO-Kontrollzellen (weiße Pfeile in Abb. 32 C, L). MRTX849- und AMG510-behandelte H23-Zellen schienen zudem eine höhere Anzahl an Vinkulin-haltigen fokalen Kontakten auszubilden (Pfeile in Abb. 32 E, H, N Q) sowie eine geringere diffuse Verteilung von Vinkulin im Zytoplasma und perinukleär als die DMSO-Kontrollzellen (Abb. 32 B, K). Wie bereits bei der Beschreibung der Phasenkontrastaufnahmen erwähnt (Kapitel 3.2.2) imponierten die MRTX849- und AMG510-behandelten H23-Zellen rundlicher und größer als die DMSO-Kontrollzellen (siehe Abb. 32).

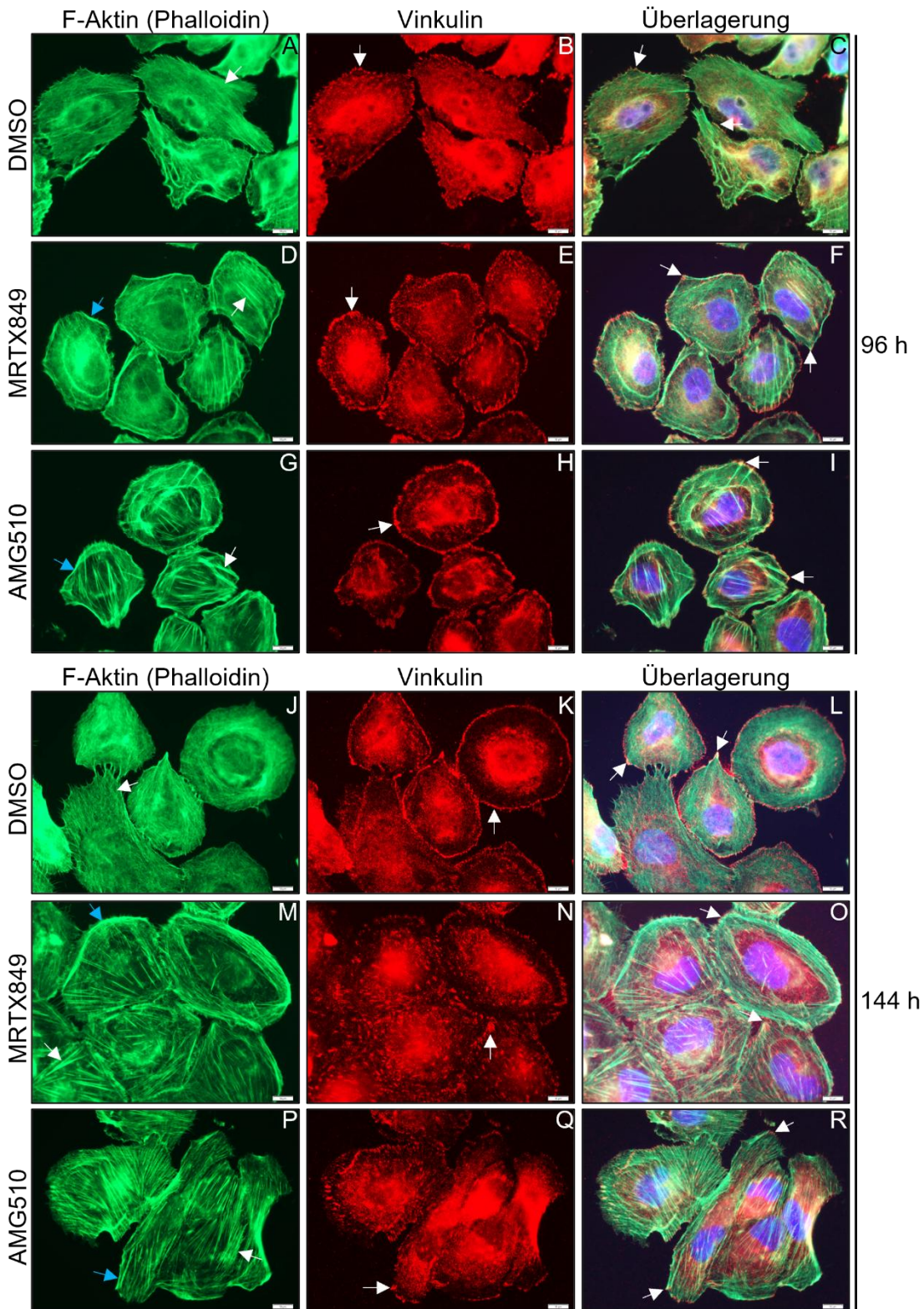


Abb. 32: Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und der Verteilung von Vinkulin in MRTX849- und AMG510-behandelten H23-Zellen. H23-Zellen wurden für 96 h mit 20 nM MRTX849 (D, E, F) bzw. AMG510 (G, H, I) und für 144 h mit 10 nM MRTX849 (M, N, O) und 20 nM AMG510 (P, Q, R) in Kulturmedium inkubiert. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen (96 h: A, B, C, 144 h: J, K, L). Für den Nachweis von F-Aktin wurde Phalloidin gekoppelt an Alexa488 verwendet. Für den Nachweis von Vinkulin wurde ein Vinkulin-Primärantikörper und ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Kernfärbung gelang mit DAPI. Je Versuch wurden 3-5 Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt, von denen ausgewählte Bilder dargestellt ist (96 h n=1; 144 h n=2). Maßstabbalken: 10 µm.

Die Untersuchung der Verteilung von Palladin (grüner Kanal) ergab im Vergleich mit den H23-Kontrollzellen in MRTX849- und AMG510-behandelten Zellen bei 144 h eine vermehrte Verteilung von Palladin unterhalb der Zellmembran, an der sich auch das kortikale Aktinnetzwerk befindet (Pfeile in Abb. 33 D, G). Diese Akkumulation von Palladin im Bereich der Zellmembran war in MRTX849-inkubierten Zellen ausgeprägter als in AMG510-behandelten Zellen. In MRTX849-behandelten Zellen wurde Palladin zudem vor allem nukleär bzw. perinukleär beobachtet, während in AMG510-behandelte Zellen Palladin diffus im Zytoplasma verteilt vorlag. Die Gelbfärbung in der Überlagerung des grünen (Palladin) und roten Kanals (Vinkulin) zeigt, dass Palladin und Vinkulin in MRTX849- und AMG510-inkubierten H23-Zellen in den gleichen Zellbereichen, insbesondere in Fokalkontakten (Pfeile in Abb. 33 F, I) vorliegen. In DMSO-Kontrollzellen war diese Gelbfärbung hingegen nicht zu beobachten (siehe Abb. 33 C).

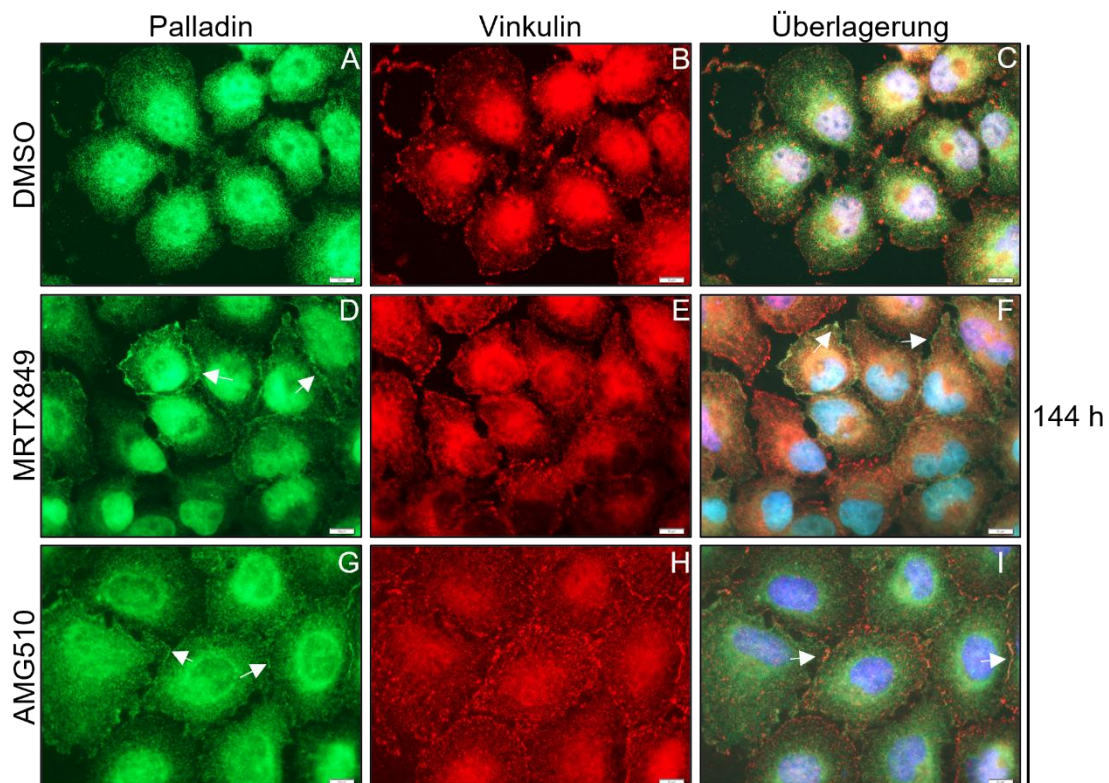


Abb. 33: Beeinflussung der Verteilung von Palladin und Vinkulin in H23-Zellen durch MRTX849 und AMG510. Die Inkubation der H23-Zellen erfolgte mit 10 nM MRTX849 (D-F) und 20 nM AMG510 (G-I) für 144 h in Kulturmedium. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle (A-C). Der Nachweis von Palladin und Vinkulin gelang mittels spezifischer Primärantikörper und Cy3- (Vinkulin) bzw. Alexa488- (Palladin) gekoppelter Sekundärantikörper. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt. Abgebildet ist je ein repräsentatives Bild aus 3-7 Aufnahmen pro durchgeführtem Versuch (Palladin: n=1; Vinkulin: n=2). Maßstabbalken: 10 µm.

Ähnlich wie die HCC-44- und H23-Zellen bildeten die DMSO-behandelten MIA PaCa-2-Zellen feine Aktinfilamente (weiße Pfeile in Abb. 34 A, J), von denen einige in Vinkulin-haltigen fokalen Kontakten endeten (weiße Pfeile in Abb. 34 C, L). Die Behandlung der MIA PaCa-2-Zellen mit MRTX849 und AMG510 führte wiederum zur Ausbildung von dicken Aktin-Stressfasern, die die Zellen durchziehen (weiße Pfeile in Abb. 34 D, G, M, P) und in Vinkulin-haltigen fokalen Kontakten enden, wie in der Überlagerung in Abb. 34 erkennbar ist (weiße Pfeile in Abb. 34 F, I, O, R; grüner Kanal: F-Aktin/Phalloidin; roter Kanal: Vinkulin). Die Ausbildung der Stressfasern war nach Behandlung der Zellen mit beiden K-Ras G12C-Inhibitoren für 144 h ausgeprägter als nach 96 h. Die DMSO-Kontrollzellen wiesen vorwiegend einzeln lokalisierte Vinkulin-haltige Fokalkontakte auf (weiße Pfeile in Abb. 34 B, K). Eine deutlich höhere Anzahl dieser Fokalkontakte konnte in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen beobachtet werden (weiße Pfeile in Abb. 34 E, H, N, Q). Dies konnte durch Quantifizierung bestätigt werden (siehe Kapitel 3.4) und wurde bereits vorangegangen ebenfalls für HCC-44- und H23-Zellen beschrieben.

Abb. 34 zeigt außerdem, dass die DMSO-behandelten MIA PaCa-2-Zellen Filopodien ausbildeten (blaue Pfeile in Abb. 34 A, J), die hingegen nach Inkubation mit MRTX849 und AMG510 für 96 h und 144 h nicht mehr erkennbar waren (Abb. 34 D, G, M, P). Verglichen mit den DMSO-Kontrollzellen, welche Zellausläufer ausbildeten, stellte sich die Morphologie der MIA PaCa-2-Zellen nach Inkubation mit MRTX849 und AMG510 bei 96 h und 144 h rundlicher dar (siehe Abb. 34). Ähnlich wie die HCC-44- und H23-Zellen, wirkten auch die MIA PaCa-2-Zellen nach Behandlung mit beiden K-Ras G12C-Inhibitoren größer als die DMSO-Kontrollzellen, was die Messung der Zellfläche bestätigte (siehe Kapitel 3.4).

Zusammengefasst zeigen die oben aufgeführten Daten, dass die Inhibition von onkogenem K-Ras G12C durch MRTX849 und AMG510 zur vermehrten Ausbildung von Aktin-Stressfasern, einer Akkumulation von Palladin in Aktin-reichen Zellbereichen und einer erhöhten Anzahl Vinkulin-haltiger Fokalkontakte führt.

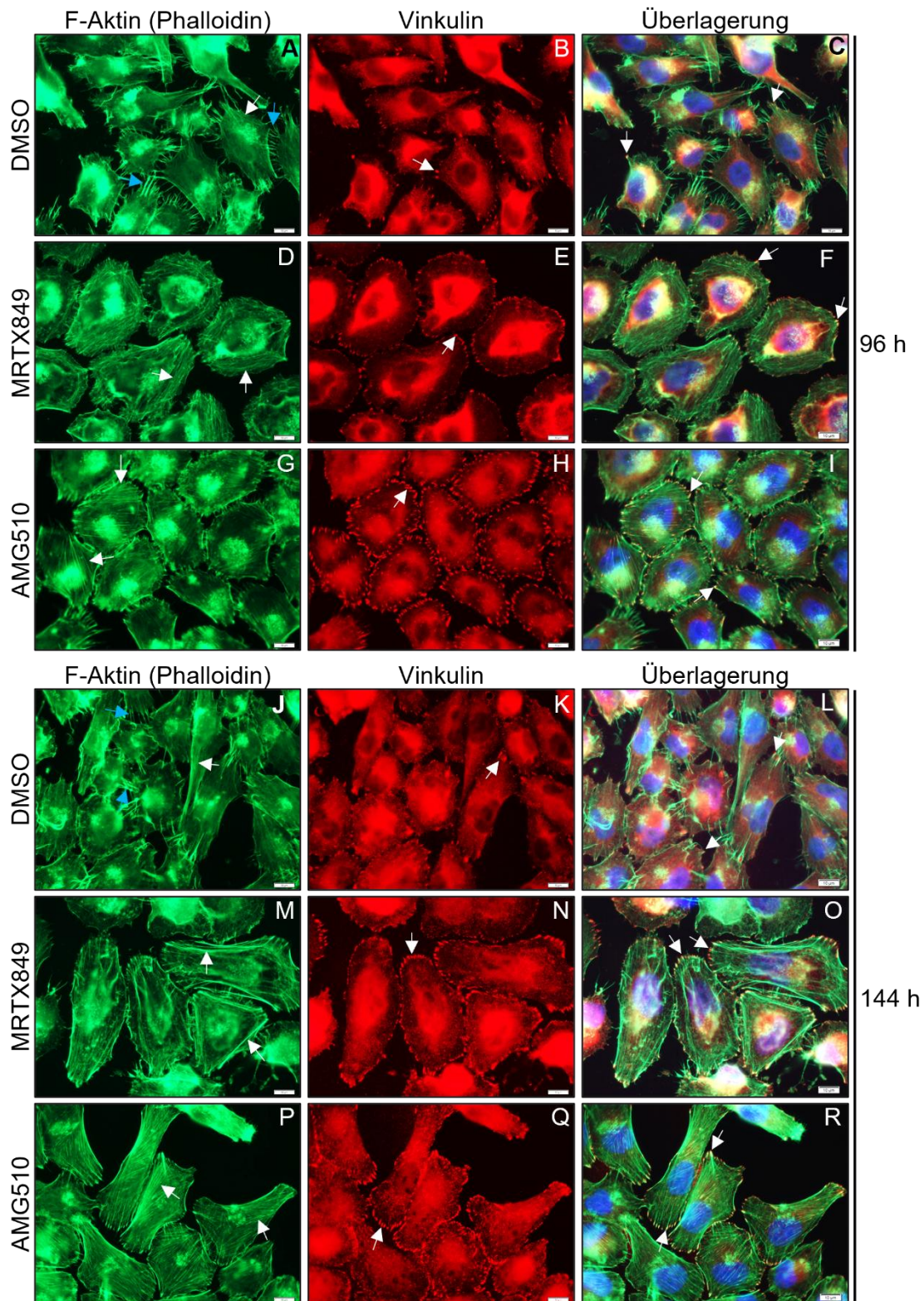


Abb. 34: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf das Aktin-Zytoskelett und die Verteilung von Vinkulin in MIA PaCa-2-Zellen. Die Behandlung der MIA PaCa-2-Zellen erfolgte für 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 (96 h: D, E, F; 144 h: M, N, O) bzw. AMG510 (96 h: G, H, I; 144 h: P, Q, R) in Kulturmedium. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle (96 h: A, B, C, 144 h: J, K, L). Für den Nachweis von F-Aktin wurde Phalloidin-Alexa488 verwendet, zum Nachweis von Vinkulin wurde der Primärantikörper anti-Vinkulin und ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 angefertigt. Abgebildet ist je eine repräsentative Aufnahme aus 4-5 Bildern je durchgeführtem Versuch (n=2). Maßstabbalken: 10 µm.

Da die Expression von onkogenem K-Ras G12V die zelluläre Verteilung von β -Catenin beeinflusst (72) und aufgrund der festgestellten Veränderungen im Aktinzytoskelett und in der Ausbildung von fokalen Kontakten wurde nun die Verteilung von β -Catenin und Paxillin untersucht. Paxillin ist ein Adapterprotein, welches neben Vinkulin in Fokalkontakten vorhanden ist (95). Paxillin und β -Catenin können wiederum miteinander interagieren (5, 28). In *adherens junctions* stellt β -Catenin über α -Catenin die Verbindung zum Aktinzytoskelett her (37, 119). Zudem kann es nach Translokation in den Zellkern Transkriptionsfaktoren regulieren (135). In Abb. 35 sind repräsentative Aufnahmen der MIA PaCa-2-Zellen und in Abb. 36 repräsentative Aufnahmen der HCC-44-Zellen abgebildet.

Die Behandlung der MIA PaCa-2-Zellen mit MRTX849 und AMG510 führte zu einer vermehrten Ausbildung β -Catenin-haltiger Plaques im Bereich der Zellmembran (weiße Pfeile in Abb. 35 C, E, J, M) und in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten (blaue Pfeile in Abb. 35 C, E, J, M) verglichen mit den DMSO-Kontrollzellen (weiße und blaue Pfeile in Abb. 35 A, G). In AMG510- und noch deutlicher in MRTX849-inkubierten Zellen wurden zudem Paxillin-haltige fokale Kontakte detektiert (Pfeile in Abb. 35 K, N), während die Kontrollzellen eine diffuse Paxillin-Verteilung im Zytoplasma ohne Paxillin-haltige Fokalkontakte aufwiesen (Pfeile in Abb. 35 H). In der Überlagerung beider Kanäle (roter Kanal: Paxillin; grüner Kanal: β -Catenin) konnte vor allem in MRTX849-inkubierten MIA PaCa-2-Zellen das Vorliegen von Paxillin und β -Catenin in gleichen Bereichen der Zellmembran detektiert werden, was sich schwächer auch in AMG510-inkubierten Zellen zeigte (Pfeile in Abb. 35 L, O). In DMSO-Kontrollzellen wurde eine Gelbfärbung im Bereich der Zellmembran jedoch nicht detektiert (Abb. 35 I), sodass in den Kontrollzellen nicht von einem Vorliegen von Paxillin und β -Catenin in gleichen Zellmembran-Bereichen ausgegangen werden kann.

Wie bereits bei den Phasenkontrastaufnahmen beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2) zeigen die hier abgebildeten Immunfluoreszenzaufnahmen deutlich, dass die MIA PaCa-2-Zellen eine rundere Zellform unter Einfluss beider K-Ras G12C-Inhibitoren annehmen.

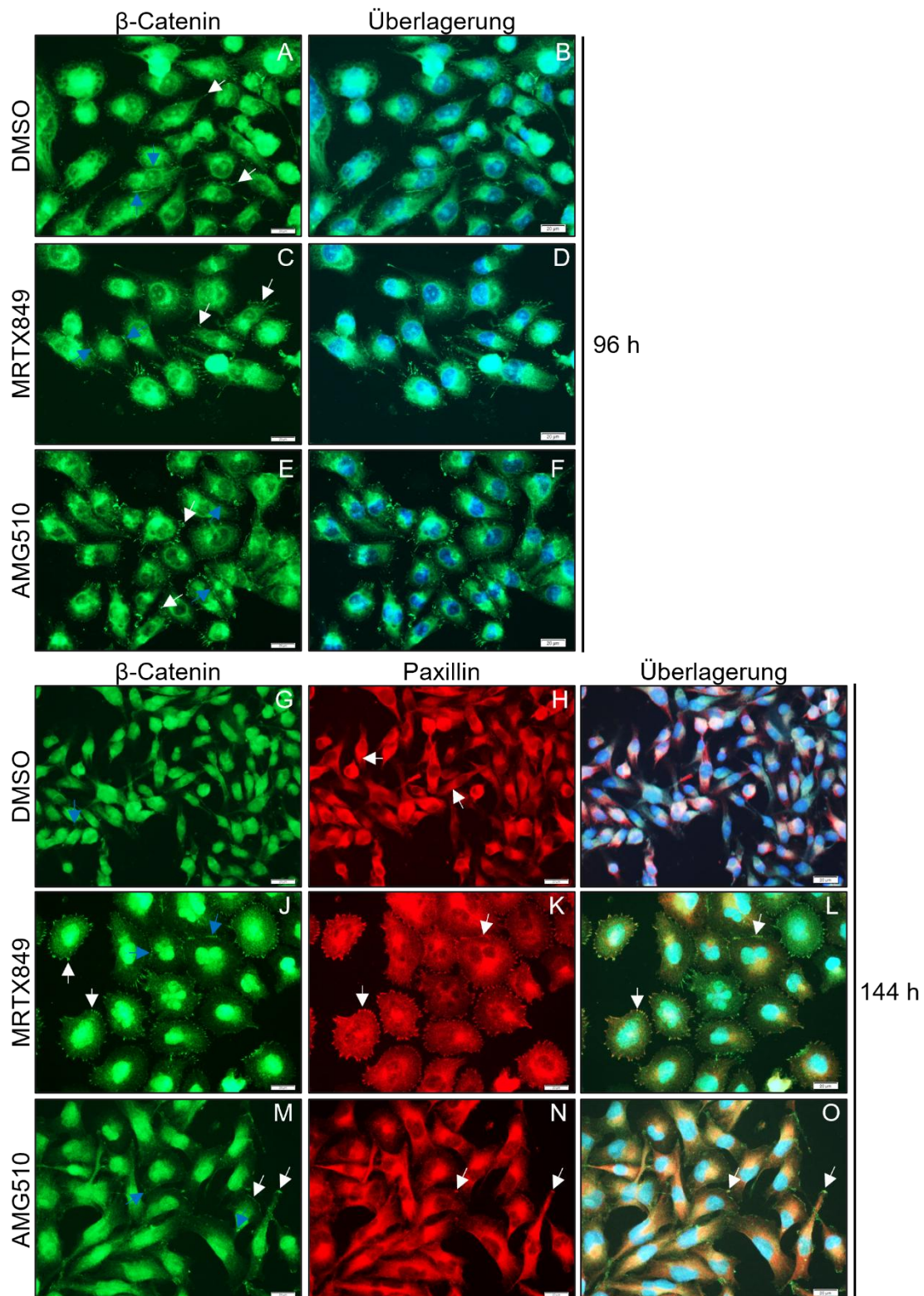


Abb. 35: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Verteilung von β -Catenin und Paxillin in MIA PaCa-2-Zellen. Die Behandlung der MIA PaCa-2-Zellen erfolgte für 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 (96 h: C, D; 144 h: J-L) und 20 nM AMG510 (96 h: E, F; 144 h: M-O) in Kulturmedium. Kontrollzellen wurden mit DMSO inkubiert (96 h: A, B; 144 h: G-I). Zur Darstellung von β -Catenin und Paxillin wurden jeweils spezifische Primärantikörper und ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper (Paxillin) bzw. ein Alexa488-gekoppelter Sekundärantikörper (β -Catenin) verwendet. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Aufgenommen wurden je Versuchsdurchführung 4-5 Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81, von denen ausgewählte Bilder abgebildet sind (Paxillin: n=1; β -Catenin: n=2). Der Maßstabbalken entspricht 20 μ m.

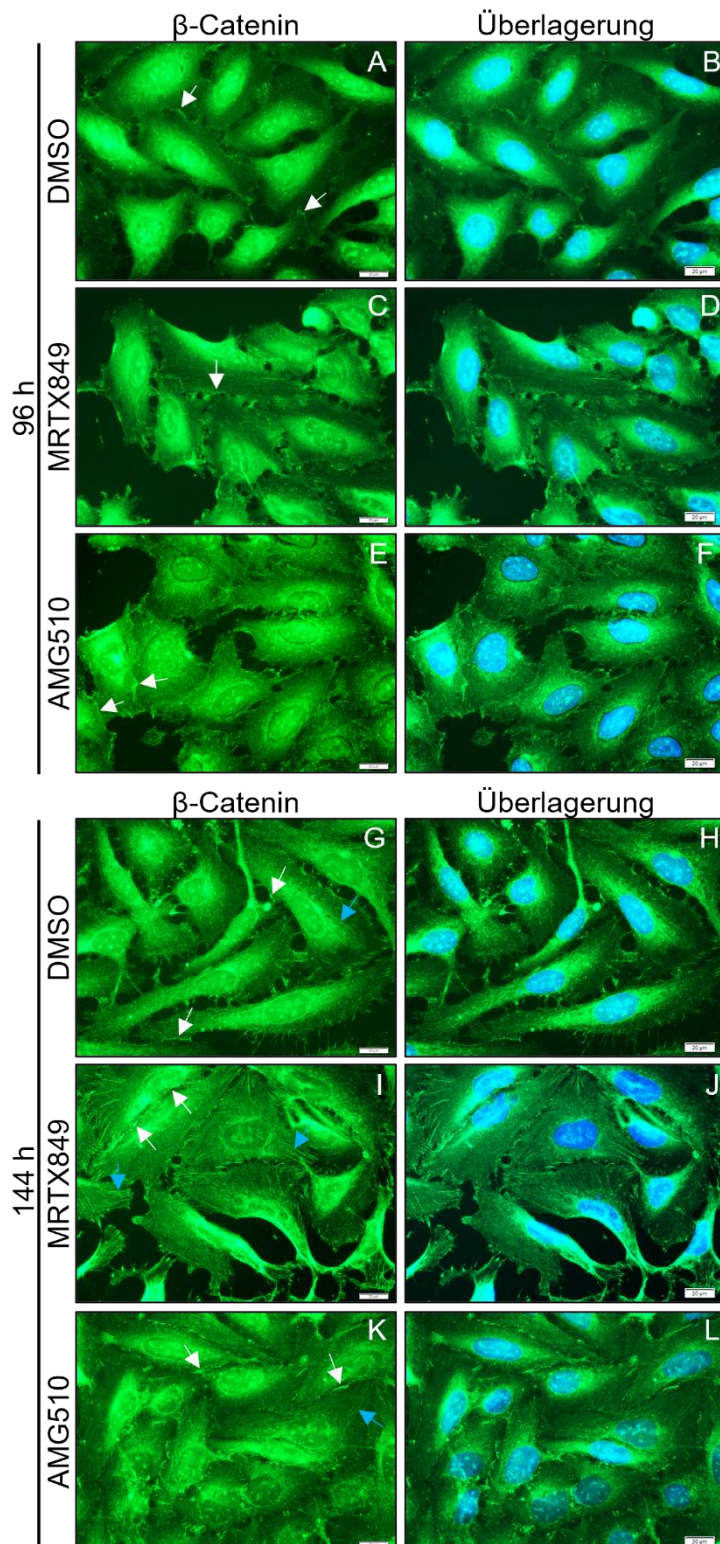


Abb. 36: Veränderungen der β -Catenin-Lokalisation in MRTX849- und AMG510-behandelten HCC-44-Zellen. Inkubiert wurden die Zellen in Kulturmedium für 96 h mit 20 nM MRTX849 (C, D) bzw. AMG510 (E, F) und für 144 h mit 10 nM MRTX849 (I, J) und 20 nM AMG510 (K, L). Als Kontrolle dienten DMSO-inkubierte Zellen (96 h: A, B, 144 h: G, H). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI und der Nachweis von β -Catenin mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper. Je durchgeführtem Versuch wurden 3-4 Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 aufgenommen, von denen ausgewählte Bilder abgebildet sind (96 h: n=1; 144 h: n=2). Maßstabbalken: 20 μ m.

Im Gegensatz zu den MIA PaCa-2-Zellen, hatte die Behandlung der HCC-44-Zellen mit MRTX849 und AMG510 keinen Einfluss auf die Ausbildung β -Catenin-haltiger Plaques in Bereichen von Zell-Zell-Kontakten (weiße Pfeile in Abb. 36 A, C, E, G, I, K).

In AMG510-, bzw. noch deutlicher in MRTX849-behandelten HCC-44-Zellen wurden bei 144 h β -Catenin-haltige streifige Strukturen beobachtet (blaue Pfeile in Abb. 36 I, K), die Aktinfilamente darstellen könnten und im Vergleich zu den DMSO-Kontrollzellen (blaue Pfeile in Abb. 36 G) deutlich ausgeprägter waren.

Zusammengefasst zeigen die dargestellten Daten, dass MIA PaCa-2-Zellen unter Einfluss von MRTX849 und AMG510 mehr β -Catenin- und Paxillin-haltige Plaques in der Zellperipherie ausbilden, während HCC-44-Zellen unter Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren β -Catenin-

haltige streifenförmige Anlagerungen ausbilden.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass die K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 zur vermehrten Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Vinkulin- bzw. Paxillin-haltigen Fokalkontakten sowie einer Akkumulation von Palladin in Aktin-reichen Zellbereichen führen. Am stärksten zeigte sich der Einfluss der untersuchten K-Ras G12C-Inhibitoren auf β -Catenin und Vimentin in MIA PaCa-2-Zellen, die unter Inhibitor-Einfluss dicke Vimentinfilamentbündel und mehr β -Catenin-haltige Plaques in der Zellperipherie ausbildeten.

3.4 Zunahme der Zellfläche und der Fokalkontakte durch K-Ras G12C-Inhibition in MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen

Da die MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen nach Inkubation mit den K-Ras G12C-Inhibitoren in den Phasenkontrast- (Kapitel 3.2.2) und Immunfluoreszenzaufnahmen (Kapitel 3.3) größer zu sein schienen als die DMSO-Kontrollzellen, wurde die Zellfläche gemessen, um mögliche Veränderungen zu quantifizieren. Hierfür wurden die Immunfluoreszenzaufnahmen von β -Catenin, Phalloidin, Palladin, Keratin und K-Ras4B (Aufnahmen nicht gezeigt) der MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen (siehe Kapitel 3.3) mit der CellSens Dimension-Software von Olympus ausgemessen. Da die Immunfluoreszenzaufnahmen der MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen zudem mehr Vinkulin- und Paxillin-haltige Fokalkontakte im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten (siehe Kapitel 3.3), wurde die Anzahl dieser Plaques mit der Software Fiji (NIH) analysiert. Eingeschlossen wurden in beide Messungen alle Bilder der HCC-44-Zellen, unabhängig von der Konzentration der K-Ras G12C Inhibitoren, da sich in den Immunfluoreszenzaufnahmen (siehe Kapitel 3.3) keine gravierenden Unterschiede zeigten. Die verwendete Konzentration für die MIA PaCa-2-Zellen betrug 20 nM MRTX849 bzw. AMG510. Die Zellfläche ist in Abb. 37 als Mittelwert \pm SD dargestellt. Abb. 38 zeigt die Anzahl Vinkulin-haltiger Fokalkontakte und Abb. 40 im Anhang die Anzahl Paxillin-haltiger Fokalkontakte pro Zelle, ebenfalls als Mittelwert \pm SD. Im Folgenden ist die mittlere Zellfläche in $\mu\text{m}^2 \pm$ SD bzw. die mittlere Anzahl Vinkulin-haltiger Plaques pro Zelle \pm SD angegeben.

In den MIA PaCa-2-Zellen (Abb. 37 A) führte die Anwesenheit von MRTX849 zur größten Zunahme der Zellfläche. So konnte bei 96 h eine Verdopplung der Zellfläche ($1187,9 \mu\text{m}^2 \pm 504,6 \mu\text{m}^2$) und bei 144 h eine Zunahme auf das 2,33-fache ($1299,1 \mu\text{m}^2 \pm 499,8 \mu\text{m}^2$) der jeweiligen DMSO-Kontrolle (96h: $595,9 \mu\text{m}^2 \pm 214,8 \mu\text{m}^2$; 144 h: $555,6 \mu\text{m}^2 \pm 201,8 \mu\text{m}^2$) gemessen werden. Die Behandlung mit AMG510 führte in den MIA PaCa-2-Zellen erst bei 144 h zu einer Verdopplung der Zellfläche ($1089,5 \mu\text{m}^2 \pm 360,3 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu DMSO-Kontrollzellen.

Die Behandlung der HCC-44-Zellen (Abb. 37 B) führte ebenfalls zu einer Zunahme der Zellfläche. Hierbei wurde die größte Zunahme auf das 1,28-fache ($4162,60 \mu\text{m}^2 \pm 1634,84 \mu\text{m}^2$) in den MRTX849-inkubierten Zellen bei 144 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($3234,22 \mu\text{m}^2 \pm 1168,39 \mu\text{m}^2$) gemessen. AMG510 führte in den HCC-44-Zellen bereits bei 96 h zur größten Zunahme auf das 1,26-fache ($3435,34 \mu\text{m}^2 \pm 1054,97 \mu\text{m}^2$) verglichen mit der DMSO-Kontrolle ($2735,916 \mu\text{m}^2 \pm 1261,47 \mu\text{m}^2$).

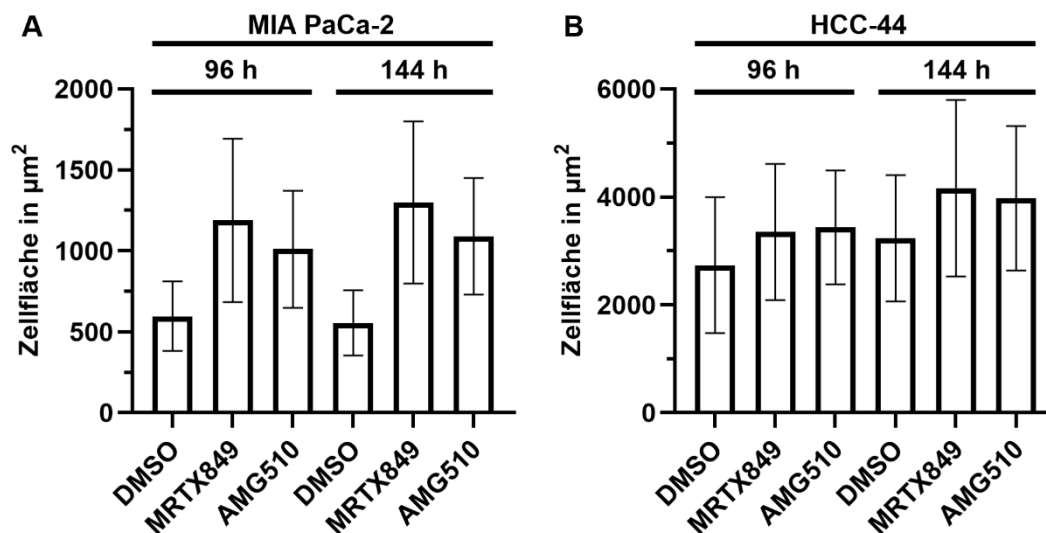


Abb. 37 A, B: Zunahme der Zellfläche der MIA PaCa-2- (A) und HCC-44-Zellen (B) nach MRTX849- und AMG510-Behandlung. MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen wurden für 96 h und 144 h mit den K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 in Kulturmedium inkubiert. Die Zellfläche wurde mit der CellSens Dimension-Software von Olympus vermessen. Hierfür wurden die Immunfluoreszenzaufnahmen von β -Catenin, Palladin, Phalloidin, K-Ras 4B und Keratin benutzt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SD der absoluten Zellfläche in μm^2 . Folgende Anzahl an Zellen wurde ausgemessen: MIA PaCa-2: 96 h: DMSO: 279; MRTX849: 205; AMG510: 221; 144 h: DMSO: 239; MRTX849: 249; AMG510: 182; HCC-44: 96 h: DMSO: 118; MRTX849: 112; AMG510: 105; 144 h: DMSO: 199; MRTX849: 195; AMG510: 158.

Für beide K-Ras G12C-Inhibitoren wurden neben der Zunahme der Zellfläche auch eine Zunahme der Vinkulin-haltigen Plaques sowohl in MIA PaCa-2- als auch in HCC-44-Zellen gemessen. Für die MIA PaCa-2-Zellen (Abb. 38 A) wurde nach MRTX849-Behandlung ein 4,2-facher (96 h; $69,22 \pm 61,54$) bzw. 3,7-facher (144 h; $107,95 \pm 42,41$) Anstieg der Vinkulin-haltigen Plaques im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (96 h: $16,59 \pm 22,78$; 144 h: $29,05 \pm 8,94$) gemessen. AMG510 führte mit einem 3,5-fachen (96 h: $58,82 \pm 40,38$) bzw. 3,3-fachen (144 h: $96,13 \pm 30,85$) Anstieg in den MIA PaCa-2-Zellen zu einer etwas geringeren Zunahme der Vinkulin-Fokalkontakte als MRTX849. Beide K-Ras G12C-Inhibitoren führten in den MIA PaCa-2-Zellen zudem zu mehr Paxillin-haltigen Plaques als in den DMSO-Kontrollzellen (siehe Abb. 40 im Anhang).

In den HCC-44-Zellen (Abb. 38 B) verdoppelte sich die Anzahl Vinkulin-haltiger Fokalkontakte nach 96-stündiger MRTX849- und AMG510-Behandlung (MRTX849: $92,40 \pm 26,33$; AMG510: $104,95 \pm 45,52$) verglichen mit DMSO-Kontrollzellen ($44,87 \pm 24,66$). Etwas geringer war der Effekt beider K-Ras G12C-Inhibitoren nach 144-stündiger Behandlung. In MRTX849- ($101,64 \pm 43,09$) und AMG510-behandelten Zellen ($101,73 \pm 25,72$) wurden 1,5-fach mehr Vinkulin-Plaques als in den jeweiligen DMSO-Kontrollzellen (144 h: $65,19 \pm 29,66$) detektiert. Damit war der Effekt der K-Ras G12C-Inhibitoren auf die Ausbildung Vinkulin-haltiger Fokalkontakte in HCC-44-Zellen etwas geringer als in den MIA PaCa-2-Zellen.

Zusammengefasst zeigen die aufgeführten Daten, dass die K-Ras G12C-Inhibition durch MRTX849 und AMG510 die Zunahme der Zellfläche und die Ausbildung Vinkulin-haltiger Fokalkontakte in MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen induziert.

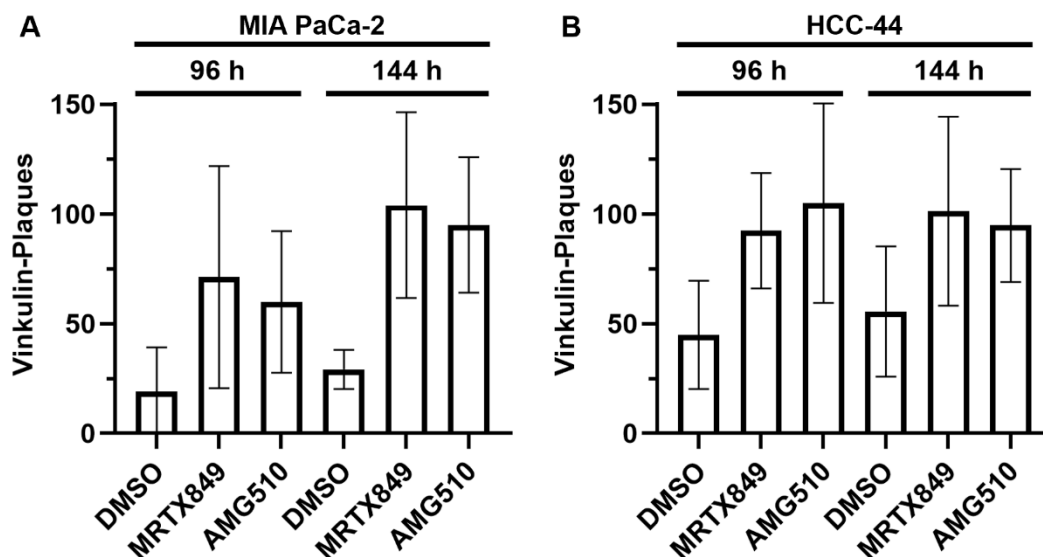


Abb. 38 A, B: MRTX849 und AMG510 führen zu einer erhöhten Bildung Vinkulin-haltiger Plaques in MIA PaCa-2- (A) und HCC-44-Zellen (B). MIA PaCa-2-Zellen wurden mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510, HCC-44-Zellen mit 10 nM oder 20 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 für 96 h und 144 h in Kulturmedium inkubiert. Kontrollzellen wurden für 96 h bzw. 144 h mit DMSO inkubiert. Der Nachweis von Vinkulin erfolgte im Immunfluoreszenzverfahren mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Anzahl der Vinkulin-haltigen Plaques wurde mit der Software Fiji (NIH) anhand der am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 aufgenommenen Bilder ermittelt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SD der ermittelten Anzahl Vinkulin-haltiger Fokalkontakte pro Zelle. Folgende Anzahl an Zellen wurde ausgemessen: MIA PaCa-2: 96 h: DMSO: 170; MRTX849: 65; AMG510: 94; 144 h: DMSO: 81; MRTX849: 94; AMG510: 48; HCC-44: 96 h: DMSO: 72; MRTX849: 29; AMG510: 30; 144 h: DMSO: 141; MRTX849: 90; AMG510: 105. Unabhängige Versuchsdurchführung: MIA PaCa-2: 96 h und 144 h: n=2; HCC-44: 96 h: n=1; 144 h: n=3).

4 Diskussion

K-Ras-Mutationen treten in über 90 % der Pankreaskarzinome und in 35 % der NSCLC-Tumore auf. Dabei tritt die K-Ras-Mutation G12C in NSCLC-Tumoren am häufigsten und in den Pankreaskarzinomen am dritthäufigsten auf (71). Diese Mutation führt zur konstitutiven Aktivierung von K-Ras durch die Reduktion der intrinsischen und der GAP-vermittelten GTPase-Aktivität (49, 109). Die Entdeckung einer geeigneten Bindungsstelle für einen *small molecule*-Inhibitor im K-Ras G12C-Molekül führte zur Entwicklung von K-Ras G12C-Inhibitoren (91). Hierzu gehören die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren MRTX849 und AMG510, die über das mutierte Cystein an K-Ras G12C binden (29, 69). Vorangegangene Studien untersuchten diese Inhibitoren bereits in *in vitro*-Versuchen und im Xenograftmodell (12, 40). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass AMG510 zur Induktion von EMT-assoziierten Veränderungen in der Verteilung des epithelialen Markerproteins E-Cadherin führte (3). Darüber hinaus führte die Induktion eines mesenchymalen Phänotyps in epithelialen Zellen zu einer vermehrten Resistenzbildung gegen AMG510 (2). Als einen Mechanismus, der für die Ausbildung der AMG510-Resistenz verantwortlich ist, wurde die K-Ras unabhängige Aktivierung von Akt identifiziert (2). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der K-Ras G12C-Inhibition auf zentrale Ras-abhängige Signalwege und auf Veränderungen der Zellen hinsichtlich ihrer epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften könnten zusätzliche Hinweise auf eine vermehrte Metastasierung der Zellen und auf die mögliche Entstehung von Resistenzen geben.

In der vorliegenden Arbeit konnte einerseits in HCC-44- und H23-Zellen gezeigt werden, dass MRTX849 und AMG510 die basale und EGF-induzierte Aktivität der Ras-abhängigen Signalmoleküle ERK1/2, Akt und S6 reduzieren. Andererseits wurde der Einfluss beider K-Ras G12C-Inhibitoren auf das Zytoskelett anhand der Ausbildung dicker Vimentinfilament-Bündel und Aktin-Stressfasern, einer erhöhten Anzahl Vinkulin-haltiger Fokalkontakte sowie mehr Paxillin- und β -Catenin-haltiger Plaques unter MRTX849- und AMG510-Einfluss gezeigt. Neben den Veränderungen des Vimentin-Zytoskeletts konnte auch eine tendenzielle Zunahme des Vimentin-Proteingehalts sowie eine tendenzielle Abnahme der Phosphorylierung von Vimentin an Serin38 in Immunoblotanalysen der MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen nachgewiesen werden. Die Veränderungen des Zytoskeletts waren einhergehend mit einer Vergrößerung der Zellfläche und einer rundlicheren Zellmorphologie.

4.1 Verminderung der Aktivität Ras-abhängiger Signalmoleküle durch MRTX849 und AMG510

Das Zellwachstum und -Überleben, sowie das Zytoskelett und damit einhergehend auch die Zellmorphologie beeinflusst Ras über die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK- (70) und des PI3K-Akt-Signalwegs (15). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand einer zunehmenden Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, und dem Akt-Effektor GSK3 α gezeigt werden, dass diese Signalmoleküle in HCC-44- und H23-Zellen trotz Vorliegen des konstitutiv aktiven K-Ras G12C durch die Wachstumsfaktoren FCS und EGF stimulierbar sind. Dies könnte auf die Stimulation anderer Ras-Isoformen, wie N-Ras, durch EGF oder FCS (33), oder auf die direkte Aktivierung von PI3K der Klasse IA durch die Rezeptortyrosinkinase des EGFR zurückzuführen sein (101). Auffällig war allerdings eine ausbleibende S6-Stimulation in EGF-behandelten H23-Zellen, während diese in den HCC-44-Zellen vorhanden war. Die fehlende Aktivierbarkeit von S6 in H23-Zellen wurde in der vorangegangenen Doktorarbeit von Frau Dr. Angela Lammert (66) ebenfalls beobachtet. Ihre und die hier vorliegenden Ergebnisse deuten in den H23-Zellen auf eine Unabhängigkeit des ribosomalen Proteins S6 von der Ras-Akt-Signalkaskade hin (66). Neben der EGF-Stimulierbarkeit Ras-abhängiger Signalmoleküle wurde in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt, dass durch zweistündige AMG510-Präinkubation in Kulturmedium die EGF-induzierte Aktivität von Akt und GSK3 α in HCC-44- und H23-Zellen sowie die EGF-induzierte ERK1/2-Aktivierung in H23-Zellen reduziert wird. Ebenso führte die AMG510-Behandlung in FCS-haltigem Kulturmedium zur Abnahme der ERK1/2-Aktivität bei 2 h und 24 h in H23-Zellen bzw. bei 24 h in HCC-44-Zellen. Qi *et al.* (2023) wiesen in HCC-44-Zellen ebenfalls eine Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung nach 2- und 24-stündiger AMG510-Behandlung im Immunoblotverfahren nach. Verwendet wurden hierbei 0,001 μ M bis 10 μ M AMG510 in *fetal bovine serum*- (FBS) haltigem Kulturmedium (99). Die abgebildeten Immunoblots von Qi *et al.* (2023) lassen auf eine konzentrationsabhängige Inhibition der ERK1/2-Aktivität schließen. Densitometrische Auswertungen wurden jedoch nicht aufgeführt (99). Mit IC₅₀-Werten zwischen 10 nM und 123 nM beschrieben auch Canon *et al.* (2019) in homo- und heterozygot K-Ras G12C-mutierten Zelllinien, unter denen auch H23-Zellen waren, dass AMG510 zur Abnahme der ERK1/2-Aktivität nach zweistündiger Behandlung in FBS-haltigem Medium führt. Die Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgte in der Studie von Canon *et al.* (2019) anhand eines *ERK1/2-phosphorylation assays* (12). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die in der vorliegenden Doktorarbeit aufgeführten Ergebnisse über die Inhibition von ERK1/2 in HCC-44- und H23-Zellen nach 2- und 24-stündiger AMG510-Behandlung mit den

Ergebnissen der vorangegangenen Studien von Canon *et al.* (2019) und Qi *et al.* (2023) übereinstimmen.

Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit zeigen außerdem, dass in HCC-44-, H23- und MIA PaCa-2-Zellen eine 48-, 96- und 144-stündige Behandlung mit MRTX849 und AMG510 die ERK1/2-Aktivität hemmt. Die vorangegangene Studie von Zhang *et al.* (2024) zeigt anhand von Immunoblotanalysen, dass die Behandlung von HCC-44-Zellen mit 5 μM MRTX849 für 72 h ebenfalls zu einer Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung der HCC-44-Zellen führt, wenn auch diese Abnahme als geringfügig beschrieben wurde (139). Kultiviert wurden die Zellen dabei in RPMI 1640 oder DMEM mit 10 % FBS und Penicillin/Streptomycin (100 U/mL) (139), während die eigenen Zellen in DMEM + 10 % FCS kultiviert wurden. Hallin *et al.* (2020) wiesen eine MRTX849-induzierte Hemmung der ERK1/2-Aktivität in MIA PaCa-2-Zellen nach 72 h mit 100 nM MRTX849 nach (40). Die eigenen Analysen zeigen darüber hinaus, dass bereits die geringere Konzentration von 20 nM MRTX849 zur Abnahme der ERK1/2-Aktivität führt. Diese Abnahme konnte zudem auch nach einem Inkubationszeitraum von 144 h nachgewiesen werden.

Die Immunoblotanalysen der eigenen Arbeit zeigten weiterhin für AMG510-behandelte H23-Zellen eine Inhibition der basalen Akt-Aktivität bei 2 h und 24 h, nicht mehr jedoch nach 48-stündiger AMG510-Behandlung in Kulturmedium. In der vorangegangenen Studie von Mohanty *et al.* (2023) wurde jedoch in H23-Zellen nach 72-stündiger AMG510-Behandlung im Immunoblotverfahren eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung beschrieben (86). In dieser Studie wurden jedoch deutlich höhere AMG510-Konzentrationen (1,6 μM , 3,2 μM , 6,4 μM) (86) verwendet als in den eigenen Analysen (1 nM bis 50 nM AMG510). Da die eigenen Versuche nur einmalig durchgeführt wurden, sind weitere Versuchsdurchführungen notwendig, um zu bestätigen, dass die verwendeten geringeren AMG510-Konzentrationen nach 48-stündiger Behandlung keinen Einfluss auf die Akt-Aktivität haben. Während die Analysen der vorliegenden Doktorarbeit für die HCC-44-Zellen nach 2-stündiger AMG510-Behandlung in Kulturmedium ebenfalls eine Abnahme der basalen Akt-Aktivität zeigten, konnte bei 24 h keine Veränderung der Akt-Aktivität und nach 48-stündiger AMG510-Behandlung (50 nM) eine Zunahme der Akt-Phosphorylierung gemessen werden. In der Studie von Qi *et al.* (2023) wurde zwar in Immunoblotanalysen von HCC-44-Zellen keine Veränderung der Akt-Phosphorylierung nach zweistündiger AMG510-Behandlung detektiert. Die 24-stündige Behandlung mit AMG510-Konzentrationen von 0,001 μM bis 10 μM führte jedoch zu einer Zunahme der Akt-Aktivität (99). In Zusammenschau mit den eigenen Analysen könnte die anhaltende Akt-Aktivität nach 24- bzw. 48-stündiger AMG510-Behandlung auf Resistenzmechanismen der HCC-44-Zellen gegenüber diesem Inhibitor hinweisen.

In MIA PaCa-2-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit für die Analyse der Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibition auf EMT-assoziierte Prozesse verwendet wurden, wurde in bereits durchgeführten Versuchen eine konzentrationsabhängige Inhibition von ERK1/2 und S6 durch MRTX849 (40) und AMG510 (12) nachgewiesen.

4.2 Nachweis der Bindung von MRTX849 und AMG510 an K-Ras G12C

In der vorliegenden Arbeit wurde im Immunoblotverfahren in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen eine elektrophoretische Mobilität von K-Ras G12C-MRTX849 und K-Ras G12C-AMG510 im Vergleich zum K-Ras G12C-Protein der Kontrollzellen detektiert. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit vorangegangenen Studien von Canon *et al.* (2019) und Hallin *et al.* (2020), die im Immunoblot ebenfalls einen elektrophoretischen Mobilitäts-*Shift* von K-Ras G12C-AMG510 (12) bzw. K-Ras G12C-MRTX849 (40) in MIA PaCa-2-Zellen beschrieben. Neben diesen Zellen wurden in beiden Studien auch Zellen der Lungenkarzinomzelllinie H358 (G12C/wt) verwendet. Als Kontrolle dienten, wie auch in den eigenen Analysen, DMSO-behandelte Zellen (12, 40). Canon *et al.* (2019) beschrieben zudem eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme des molekularen *Shifts* von K-Ras G12C-AMG510 anhand von Verdünnungsreihen, reichend von 1 nM bis 1 µM AMG510 mit Inkubationszeiten von 4 h bzw. 24 h (12). Konzentrationsabhängige Effekte wurden auch von Hallin *et al.* (2020) beschrieben, wobei MRTX849-Konzentrationen von 2 nM bis 1 µM verwendet wurden und das Maximum bei 15,6 nM MRTX849 lag (40). In der vorliegenden Arbeit wurden konzentrationsabhängige Effekte der K-Ras G12C-Inhibitoren auf den molekularen *Shift* nicht untersucht. In den eigenen Analysen konnte jedoch eine geringere elektrophoretische Laufrate des MRTX849- und AMG510-gebundenen K-Ras G12C-Proteins im Immunoblot für 48 h, 96 h und 144 h nachgewiesen werden, während in den vorbeschriebenen Studien eine reduzierte elektrophoretische Laufrate von K-Ras G12C-MRTX849 nur bis 72 h (40) bzw. von K-Ras G12C-AMG510 bis 24 h (12) untersucht wurde.

Beide Arbeitsgruppen schlussfolgerten aus der veränderten elektrophoretischen Laufrate des Inhibitor-gebundenen K-Ras G12C-Proteins im SDS-Gel eine Bildung kovalenter Addukte (12, 40), weshalb auch in der vorliegenden Arbeit von einer kovalenten Bindung der Inhibitoren an K-Ras G12C für die untersuchten Behandlungszeiträume ausgegangen werden kann.

4.3 Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren auf EMT-assoziierte Prozesse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf zelluläre Prozesse der EMT untersucht. Die vorliegenden Untersuchungen weisen auf eine mögliche EMT-Induktion in den Inhibitor-behandelten MIA PaCa-2-Zellen hin. In den untersuchten NSCLC-Zelllinien zeigten sich kaum Unterschiede in der Proteinexpression der EMT-Markerproteine E-Cadherin und Vimentin, jedoch führten die K-Ras G12C-Inhibitoren auch in diesen Zellen zu Veränderungen des Aktin- und Vimentinzytoskeletts und damit einhergehend auch der Zellmorphologie. Da vor allem die Veränderungen des Vimentin- und Aktinzytoskeletts und die veränderte Verteilung des Adapterproteins Vinkulin in den H23-Zellen denen der MIA PaCa-2-Zellen ähneln, kann auch in diesen Zellen eine mögliche EMT-Induktion vermutet werden. Die unterschiedlichen Ausprägungen der Reaktion auf die Inhibitoren könnten durch die zellspezifische Sensitivität für MRTX849 und AMG510 erklärt werden. Im Vergleich zwischen NSCLC-Zelllinien wurden H23- und HCC-44-Zellen anhand eines *Growth Assays* als intermediär sensitiv gegenüber AMG510 eingestuft (2). HCC-44-Zellen wurden anhand der Wachstums-Inhibition von Zhang *et al.* (2024) ebenfalls als relativ resistent gegenüber AMG510 und MRTX849 eingestuft (139). Anhand eines Proliferationsassays wurden MIA PaCa-2- und H23-Zellen wiederum als sensitiver gegenüber AMG510 klassifiziert als HCC-44-Zellen (99).

Die Erforschung von EMT-Prozessen ist von Bedeutung für potenzielle Resistenzentwicklungen. Adachi *et al.* (2020) publizierten, dass die Induktion von EMT-assoziierten Prozessen durch TGF β -Behandlung bzw. durch Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren Twist und Snail zur AMG510-Resistenz in NSCLC-Zellen beiträgt (2). Darüber hinaus wurden in dieser Studie NSCLC-Zellen, die durch Inkubation mit steigenden AMG510-Konzentrationen eine Resistenz entwickelten, ein erhöhter Vimentin- und ein reduzierter E-Cadherin-Proteingehalt im Immunoblotverfahren nachgewiesen. Erwähnt wurden in dieser Publikation außerdem EMT-assoziierte morphologische Veränderungen dieser AMG510-resistenten Zellen, die jedoch nicht näher aufgeführt wurden (2). Übereinstimmend damit waren auch Untersuchungen von Zhang *et al.* (2024), die anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten, dass die Depletion von *tissue factor* in HCC-44-Zellen zu einer höheren E-Cadherin- und geringeren Vimentin-Proteinexpression führt. Damit ging gleichzeitig eine höhere Sensibilität dieser *tissue-factor*-depletierten Zellen gegenüber AMG510- und MRTX849 einher, was anhand einer abnehmenden Zellproliferation unter Inhibitor-Einfluss gezeigt wurde (139).

4.3.1 Veränderung der Zellform durch die K-Ras G12C-Inhibitoren

Die Morphologie von Zellen kann durch die Expression von onkogenem K-Ras beeinflusst werden. Dies wurde von Pollock *et al.* (2005) anhand einer flacheren Morphologie von K-Ras G13D-deletierten Kolonkarzinomzellen, verglichen mit parentalen K-Ras G13D-mutierten Kolonkarzinomzellen beschrieben (96). Die Expression von onkogenem K-Ras G12V in murinen intestinalen epithelialen IEC-6-Zellen führte wiederum zu einer fibroblastoiden Zellform (72). Für Pankreaskarzinomzellen wurde ebenfalls gezeigt, dass die Expression von konstitutiv aktivem EGFP-K-Ras V12 in PANC-1-Zellen zu einem fibroblastoiden Phänotyp mit Membranausstülpungen führt (27). Gleichfalls zeigten die eigenen Analysen Veränderungen der Zellform der MIA PaCa-2-, H23- und HCC-44-Zellen unter Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510. Die MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen zeigten eine rundlichere bzw. polygonale Zellform nach einer maximalen Behandlungsdauer von 144 h. Von allen drei untersuchten Zelllinien zeigten die MIA PaCa-2-Zellen die deutlichsten morphologischen Veränderungen, was mit der unterschiedlichen Sensitivität (siehe Kapitel 4.3) oder dem unterschiedlichen K-Ras G12C-Mutationsstatus der untersuchten Zellen zusammenhängen könnte, wobei die MIA PaCa-2-Zellen homozygot (36), die H23-Zellen ebenfalls homozygot und die HCC-44-Zellen allerdings heterozygot K-Ras G12C-mutiert sind (85). Die in den eigenen Untersuchungen beobachteten morphologischen Veränderungen der MIA PaCa-2-Zellen unter K-Ras G12C-Inhibition wurden auch in weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl während der Entwicklung von MRTX849- und AMG510-resistenten MIA PaCa-2-Zellen beobachtet, die hierfür für mehrere Passagen mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen kultiviert wurden (K. Giehl, persönliche Kommunikation). Chan *et al.* (2023) berichteten über die vermehrte Ausbildung von Membranprotrusionen in AMG510-resistenten MIA PaCa-2-Zellen, die hierfür für zwei Monate mit steigenden AMG510-Konzentrationen von 0,1 μM bis 5 μM kultiviert wurden (17). Eindeutige Membranprotrusionen konnten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit bei einer 144-stündigen Behandlung der Zellen mit niedrigeren MRTX849- bzw. AMG510-Konzentration von 10-20 nM allerdings nicht beobachtet werden.

Neben Veränderungen der Zellmorphologie konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine Vergrößerung der Zellfläche der MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen gemessen werden. Die größte Zunahme der Zellfläche der HCC-44-Zellen betrug das 1,26- bzw. 1,28-fache nach 96-stündiger AMG510- bzw. 144-stündiger MRTX849-Behandlung. Eine deutlichere Zunahme der Zellfläche wurde bei 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 für die MIA PaCa-2-Zellen gemessen. Hier konnte für beide

Inhibitoren eine Verdopplung der Zellfläche nach 96- bzw. 144-stündiger Inkubationszeit gemessen werden. Eine Zunahme der Zellfläche konnte auch in weiterführenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe während der Kultivierung von MRTX849- und AMG510-resistenten MIA PaCa-2- und H358-Zellen, die für mehrere Passagezeiten mit steigenden Inhibitorkonzentrationen behandelt wurden, beobachtet werden (K. Giehl, persönliche Kommunikation). Die von Chan *et al.* (2023) kultivierten AMG510-resistenten MIA PaCa-2- und LU65-Zellen wurden als groß und mit flacher Morphologie beschrieben, wobei eine Quantifizierung der Zellgröße jedoch nicht erfolgte (17). Es ist allerdings zu beachten, dass die eigenen Messungen an Zellen, die zweidimensional auf einem Plastikboden gewachsen sind, durchgeführt wurden, weshalb weder das Zellvolumen noch die Zellhöhe gemessen werden konnten. In einer anderen Studie erfolgte die Analyse der Zellgröße zudem bei Zellen, die sich in der gleichen Zellzyklusphase befanden (67). Unterschiede in den Zellzyklusphasen konnten jedoch im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode nicht berücksichtigt werden.

4.3.2 Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren auf das mesenchymale Markerprotein Vimentin

Um in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibitoren auf Prozesse der EMT zu analysieren, wurde vor allem das mesenchymale Markerprotein Vimentin untersucht. In epithelialen Zellen führt die Vimentinexpression zu einer schnelleren und individuellen Beweglichkeit sowie zu Veränderungen der Zellform (83). Für Brustkrebszellen wurde bereits aufgezeigt, dass die exogene Expression von onkogenem K-Ras G13D zu einem erhöhten Vimentin-Proteingehalt, einhergehend mit einer vermehrten Migrations- und Invasionsfähigkeit führt (58). Weitere Untersuchungen wiesen ebenfalls nach, dass die exogene Expression von EGFP-K-Ras G12V in Pankreaskarzinomzellen zu einer höheren Invasivität und Migrationsfähigkeit führt (27). Da Kim *et al.* (2015) zeigten, dass die Suppression von K-Ras mittels siRNA zu einem geringeren Vimentin-Proteingehalt führt (58), wäre demnach zu erwarten, dass die K-Ras G12C-Inhibition durch MRTX849 und AMG510 ebenfalls zur Reduktion des Vimentin-Proteingehalts führen könnte. Dies lässt sich für die kürzesten Inkubationszeiten (16 h und 48 h) anhand einer tendenziellen Abnahme des Vimentin-Proteingehalts in allen drei untersuchten Zelllinien in den Immunoblotanalysen der vorliegenden Arbeit nach AMG510-, nicht aber nach MRTX849-Behandlung, erkennen. Diese Ergebnisse der Immunoblots zeigten hohe Standardabweichungen, werden allerdings durch die RT-qPCR-Analyse der vorliegenden Arbeit gestützt. Diese ergab nach 48-stündiger AMG510- und MRTX849-Behandlung eine verringerte Vimentin-

Genexpression in MIA PaCa-2-Zellen. Da für den Behandlungszeitraum von 48 h allerdings nur eine einmalige Durchführung der RT-qPCR erfolgte, sind zur Bestätigung dieses Ergebnisses weitere Versuchsdurchführungen notwendig. Die eigenen Ergebnisse für die Abnahme des Vimentin-Proteingehalts und der Vimentin-Genexpression nach 48-stündiger Inkubationszeit stehen im Gegensatz zu Ergebnissen von Adachi *et al.* (2023), die eine EMT-Induktion durch MRTX849 und AMG510 bereits bei 48 h in den epithelialen und sensitiven H358-Zellen anhand einer Umverteilung von E-Cadherin aus Zell-Zell-Kontakten ins Zytoplasma zeigten (3). Allerdings wurden hierbei 20- bzw. 50-fach höhere Konzentrationen von MRTX849 (500 nM) und AMG510 (1 µM) verwendet (3) als in den eigenen Analysen (20 nM MRTX849; 20 nM AMG510), in denen die Konzentrationen so gewählt wurde, dass die Zellen keine deutlichen apoptotischen Merkmale aufwiesen. Adachi *et al.* (2023) publizierten weiterhin, dass die Relokalisation von E-Cadherin bei 48 h durch AMG510-Entzug reversibel bzw. durch eine anhaltende Behandlung bis 96 h zunehmend war (3). Dies steht wiederum im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die in Zusammenschau der Ergebnisse zu den MIA PaCa-2-Zellen nach der längsten Inhibitor-Exposition für 144 h aufgrund der tendenziellen Zunahme des Vimentin- und der Abnahme des Keratin-Proteingehalts im Immunoblotverfahren sowie der Umverteilung dieser Proteine in der Immunfluoreszenz eine EMT-Induktion vermuten lassen. Zusammen mit den oben aufgeführten Ergebnissen von Adachi *et al.* (2023) stellt sich die Frage, ob die MIA PaCa-2-Zellen eine längere AMG510- bzw. MRTX849-Behandlungsdauer bis zur Induktion von EMT-assoziierten Veränderungen benötigen als die von Adachi *et al.* (2023) untersuchten H358-Zellen. Außerdem stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Konzentration der K-Ras G12C-Inhibitoren zu einer Verkürzung der Behandlungsdauer bis zur Ausbildung EMT-spezifischer Veränderungen oder zu ausgeprägteren EMT-assoziierten Veränderungen führen könnte.

Die hier dargestellten eigenen Ergebnisse belegen Zelllinien-spezifische Unterschiede, da zum einen der E-Cadheringehalt in den HCC-44-Zellen, nicht aber in den H23-Zellen nach der längsten Inhibitor-Behandlung tendenziell zunahm. Zum anderen ergaben die Immunoblotanalysen für die H23- und HCC-44-Zellen, im Gegensatz zu den MIA PaCa-2-Zellen, im Mittel keine Abnahme des Vimentin-Proteingehalts. Die H23-Zellen bildeten jedoch ebenso wie die MIA PaCa-2-Zellen, dickere Vimentinfilament-Bündel und zudem perinukleäre Vimentin-Verdichtungen unter Inhibitor-Einfluss aus. Diese Vimentinfilament-Bündel wurden allerdings nicht in Inhibitor-behandelten HCC-44-Zellen nachgewiesen. Hierbei stellt sich die Frage, ob eine längere Inhibitor-Exposition zum Umbau der Vimentinfilamente in HCC-44-Zellen führen könnte oder diese Zellen auf die K-Ras G12C-Inhibitoren nicht mit einer Reorganisation des Vimentinzytoskeletts

reagieren. Zur Klärung dieser Fragen sollten entsprechende weiterführende Experimente mit deutlich höheren Inhibitorkonzentrationen und einem über 144 h hinausgehenden Inkubationszeitraum durchgeführt werden. Möglich wären auch Studien zur Resistenzbildung, wofür die HCC-44-Zellen für mehrere Passagenzeiten mit den K-Ras G12C-Inhibitoren kultiviert werden müssten.

Die in den Inhibitor-behandelten MIA PaCa-2-Zellen beobachtete Zunahme des Vimentin-Proteingehalts und die Entwicklung deutlich dickerer Vimentinfilament-Bündel, die nicht mit einer erhöhten Vimentin-Genexpression einhergeht, deutet auf die Stabilisation der Vimentinfilamente in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen hin. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die Ergebnisse der RT-qPCR teils hohe Standardabweichungen aufwiesen. Um die Genauigkeit und Aussagekraft dieser Ergebnisse zu verbessern, könnte die Verwendung von Triplets anstelle von Doppelwerten und eine Erhöhung der Versuchszahl dienen. Der Auf- und Abbau des Vimentin-Zytoskeletts kann durch Phosphorylierung reguliert werden (76). Bekannte Phosphorylierungsstellen von Vimentin sind unter anderem Serin38 und Serin83 (76). Cogli *et al.* (2013) wiesen nach, dass eine Überexpression der GTPase Rab7a in HeLa-Zellen zu einer erhöhten Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 und Ser55 und einem vermehrten Vorliegen von Vimentin in der löslichen Form führt (20). Dabei gab es keine Veränderungen der Vimentin-Proteinmenge oder -Genexpression. An Ser38 und Ser55 phosphoryliertes Vimentin wurde in dieser Studie (20) nur in der löslichen, also nicht-filamentösen Fraktion des Zelllysats nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass Rab7a die Vimentin-Assemblierung über die Phosphorylierung von Vimentin beeinflusst (20). Eine weitere Studie von Helfand *et al.* (2011) zeigte, dass die Serumstimulation Serum-deprivierter Fibroblasten zu einer Retraktion von Vimentin-Filamenten aus der Zellperipherie führt (44). Immunoblotting und Immunfluoreszenzanalysen belegen eine höhere Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 nach Serumstimulation dieser Zellen, was auf eine Regulation der Vimentin-Filamentdynamik über Phosphorylierung hinweist (44). In der vorliegenden Arbeit führte die Inhibition von K-Ras G12C für jeden Behandlungszeitraum in MIA PaCa-Zellen zu einer tendenziellen Verminderung der Phosphorylierung von Vimentin an Ser38. In Zusammenschau mit den in den Immunfluoreszenzaufnahmen nachgewiesenen dicken Vimentinfilament-Bündeln und der Zunahme des Vimentinproteingehalts, könnte die geringere Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 in den Inhibitor-behandelten MIA PaCa-2-Zellen zu einem verminderten Abbau der Vimentinfilamente führen. Neben Serin38 könnten noch weitere Vimentin-Phosphorylierungsstellen in der Reorganisation des Vimentinfilament-Systems durch die K-Ras G12C-Inhibition involviert sein. Um

diese zu identifizieren sind weitere Untersuchungen mit entsprechenden phospho-Protein- bzw. Protein-spezifischen Antikörpern notwendig.

Da sich nach 48-stündiger Inkubation mit MRTX849 und AMG510 sowohl für die MIA PaCa-2- als auch für die HCC-44-Zellen ein diskreter Abfall der Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 zeigte, wurde die Tritonfraktionierung durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren auf die Verteilung von Vimentin in lösliches oder Membran- bzw. Organellen-gebundenes Protein zu detektieren. Es wurde im Gegensatz zu E-Cadherin, für welches in H358-Zellen eine zytoplasmatische Umverteilung nach 48-stündiger K-Ras G12C-Inhibition beschrieben wurde (3), in den eigenen Analysen keine Umverteilung von Vimentin in Filamente oder lösliches Protein bei 48 h beobachtet. In MIA PaCa-2- und HCC-44-Zellen wurde sowohl in der tritonlöslichen als auch in der tritonunlöslichen Fraktion eine tendenzielle Abnahme der Phosphorylierung von Vimentin an Ser38 nach Behandlung mit MRTX849 und AMG510 detektiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Inhibition von K-Ras G12C zur Abnahme der Phosphorylierung an Ser38 von löslichem als auch in Filamenten gebundenem Vimentin führt. Allerdings könnten Verunreinigungen bei der Fraktionierung dieses Ergebnis beeinflussen. Zur genaueren Analyse der Verteilung von phosphorylierten Vimentinfilamenten könnten weiterführende Untersuchungen in der Immunfluoreszenz mit Co-Detektion von Vimentin und phosphoryliertem Vimentin dienen.

Die eigenen Analysen zeigen außerdem, dass die Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung nach der längsten Behandlungszeit von 144 h in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen geringer ist als die Abnahme nach den kürzeren Behandlungszeiten von 16 h und 48 h. Für die NSCLC-Zellen ließ sich diese Tendenz jedoch nicht erkennen. Ryan *et al.* (2020) beschrieben nach 72-stündiger AMG510-Behandlung von MIA PaCa-2-Zellen ebenfalls eine geringere Suppression der ERK1/2-Aktivität und weiterer Moleküle des MAPK-Signalwegs als nach den kürzeren Inkubationszeiten von 4 h bis 48 h (106). Nachgewiesen wurde dies im Immunoblotverfahren mit u.a. MIA PaCa-2-Zellen nach Behandlung mit 100 nM AMG510. Ryan *et al.* (2020) vermuteten, dass die wiederkehrende Aktivität dieser Signaltransduktionsmoleküle auf Rückkopplungs-Mechanismen hindeutet, die die Wirksamkeit der K-Ras G12C-Inhibitoren einschränkt (106). Die geringere ERK1/2-Suppression mit zunehmender Behandlungsdauer in der hier vorliegenden Doktorarbeit könnte ebenfalls aufgrund von Feedback-Mechanismen auftreten. Adachi *et al.* (2020) publizierten weiterhin, dass EMT-assoziierte Prozesse zur erworbenen Resistenz gegenüber AMG510 beitragen (2). Da die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit in den MIA PaCa-2-Zellen einen steigenden Vimentin-Proteingehalt nach 144-stündiger

MRTX849- und AMG510-Behandlung zusammen mit einer Reorganisation des Zytoskeletts aufzeigen, könnten neben Feedback-Mechanismen auch EMT-assoziierte Prozesse zu einer geringeren Wirksamkeit der K-Ras G12C-Inhibitoren führen. Weitere Forschung ist allerdings zur Identifizierung der genauen Resistenzmechanismen notwendig.

4.3.3 Erhöhte Aktin-Stressfaserbildung durch MRTX849 und AMG510

Veränderungen der Zellmorphologie gehen mit Veränderungen der Aktinfilament-Organisation einher, wie z.B. der Bildung von Aktin-Stressfasern (6). Ras kann die Organisation von Aktinfilamenten über die Aktivierung von PI3K beeinflussen, die wiederum zur Aktivierung von Rac- und Rho-Proteinen führt (26). So konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von onkogenem K-Ras zur Veränderung von Aktinfilamenten und Fokalkontakten führt (27, 96). K-Ras G13D-exprimierende Kolonkarzinomzellen bildeten keine Aktin-Stressfasern, während die Deletion dieses onkogenen K-Ras zur vermehrten Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Fokalkontakten führte (96). Ebenso führte die Expression von onkogenem EGFP-K-Ras V12 zum Verlust der Aktin-Stressfasern in Pankreaskarzinomzellen (27). Damit übereinstimmend zeigen die eigenen Immunfluoreszenzanalysen der vorliegenden Arbeit, dass DMSO-behandelte Kontrollzellen der NSCLC-Zelllinien HCC-44 und H23 und der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 mit konstitutiv aktivem K-Ras G12C ein feines Aktinfilament-Netzwerk ausbilden. Hingegen führte in allen drei untersuchten Zelllinien die Inhibition von K-Ras G12C durch MRTX849 (10-20 nM) bzw. AMG510 (20 nM) für 96 h und 144 h zur vermehrten Ausbildung von Aktin-Stressfasern, die die Zellen teils komplett durchspannen. Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass die EMT-Induktion mittels TGF β zur Ausbildung von Stressfasern führt (43, 79, 90, 107). Somit könnte folglich die Ausbildung der Aktin-Stressfasern in MRTX849- und AMG510-behandelten Zellen auf die Induktion eines mesenchymalen Phänotyps durch die K-Ras G12C-Inhibitoren hinweisen. In einer vorangegangenen Studie wurde zudem in MIA PaCa-2-Zellen, die durch zweimonatige Behandlung mit steigenden AMG510-Konzentrationen bis 5 μ M eine Resistenz gegenüber AMG510 entwickelten, die vermehrte Ausbildung von Aktin-Stressfasern beobachtet (17). Dies lässt darauf schließen, dass die in den eigenen Untersuchungen gezeigte Aktin-Stressfaserbildung durch 144-stündige MRTX849- und AMG510-Behandlung, auch bei länger anhaltender Inhibitor-Inkubation bestehen bleibt. Diese Folgerung lässt sich auch auf die Ausbildung von fokalen Vinkulin- bzw. Paxillin-haltigen Kontakten übertragen, da diese in MRTX849- und AMG510-behandelten Zellen in der vorliegenden Arbeit und in AMG510-resistenten MIA PaCa-2-Zellen von Chan *et al.* (2023) ebenfalls vermehrt vorlagen (17).

Die Quervernetzung von Aktinfilamenten kann durch das Aktin-assoziierte Protein Palladin erfolgen (24). Eine mögliche Verbindung von Ras und Palladin könnte über den PI3K-Akt-Signalwege folgen, da die Isoform Akt1 die Palladin-Aktivität regulieren kann (18, 19) und die Isoform Akt2 die Proteinexpression von Palladin beeinflusst (18). Die eigenen Ergebnisse weisen auf eine mögliche Quervernetzung der Aktinfilamente durch Palladin hin, da die Behandlung der HCC-44-Zellen mit den K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 für 144 h zu einer vermehrten Anlagerung von Palladin in Bereichen von Aktin-Stressfasen führte. In H23-Zellen zeigte sich vor allem nach MRTX849-Inkubation eine vermehrte Anlagerung von Palladin in Bereichen der Zellmembran, wobei in diesen Zellen auch vermehrt kortikales Aktin detektiert wurde. Da die Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibitoren auf die Verteilung von Palladin in der vorliegenden Arbeit in den HCC-44- und H23-Zellen jeweils einmalig mittels Immunfluoreszenz untersucht wurde, sind Wiederholungen dieses Versuchsansatzes notwendig, um diese Aussage zu festigen. Hierbei könnte auch die Co-Detektion von Palladin und Aktin zur genaueren Untersuchung erfolgen.

4.3.4 β -Catenin- und Paxillin-Reorganisation in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die K-Ras G12C-Inhibition durch MRTX849 und AMG510 in MIA PaCa-2-Zellen zu einer vermehrten Anreicherung von β -Catenin in Plaques im Bereich der Zellmembran und in Zell-Zell-Kontakten führt. Während MIA PaCa-2-Kontrollzellen eine diffuse Paxillin-Verteilung aufwiesen, bildeten AMG510- und MRTX849-behandelte MIA PaCa-2-Zellen vermehrt Paxillin-haltige Fokalkontakte. Hierbei wurde in Inhibitor-behandelten Zellen auch das Vorliegen von β -Catenin und Paxillin in gleichen Zellmembranbereichen beobachtet. β -Catenin dient einerseits als Adapterprotein für die Verankerung des Aktinzytoskeletts an E-Cadherin in Adhärens-Kontakten (119), andererseits kann β -Catenin als Kotranskriptionsaktivator die Expression von Genen im Nukleus beeinflussen (117), worüber auch die Vimentinexpression beeinflusst werden kann (34). Lemieux *et al.* (2015) beschrieben in IEC-6 Zellen, einer murinen intestinalen epithelialen Krypten-Zelllinie, dass die Expression von onkogenem K-Ras G12V mittels retroviraler Transduktion neben einem fibroblastoiden Phänotyp und einer geringeren E-Cadherin-Proteinexpression auch zu einer Umverteilung von β -Catenin in den Zellen führt. Anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen wurde gezeigt, dass β -Catenin in K-Ras G12V-exprimierenden Zellen aus Zell-Zell-Kontakten in das Zytoplasma und den Zellkern umverteilt wurde (72). Daher erscheint es schlüssig, dass in den eigenen Immunfluoreszenzaufnahmen die Inhibition des onkogenen K-Ras G12C durch AMG510

und MRTX849 in MIA PaCa-2-Zellen zu einer vermehrten Ausbildung von β -Catenin-haltigen Plaques in der Zellperipherie führte. Zur genaueren Evaluation des Einflusses der K-Ras G12C-Inhibitoren auf die Verteilung von β -Catenin könnte dessen Verteilung anstatt wie in den eigenen Analysen mittels Gesamtzell-Lysaten, in Kern-Zytosol-Fraktionierungen untersucht werden. Denn es wurde bereits gezeigt, dass β -Catenin am Rand invasiver Tumor-Bereiche vermehrt nukleär vorhanden ist (9, 34) und onkogenes K-Ras G12V zu einer Umverteilung von β -Catenin aus Zell-Zell-Kontakten sowohl in das Zytoplasma als auch den Zellkern führt (72).

Die Immunoblotanalysen der vorliegenden Arbeit ergaben zwar für MRTX849- und AMG510-behandelte MIA PaCa-2-Zellen bei 48 h bis 96 h eine Abnahme des β -Catenin-Proteingehalts. Diese Abnahme ist jedoch bei einmaligem β -Catenin-Nachweis in dieser Zelllinie nicht signifikant. Für die HCC-44-Zellen und auch die H23-Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen des β -Catenin-Proteingehalts unter MRTX849- oder AMG510-Einfluss nachgewiesen. Die Inkubation der MIA PaCa-2-Zellen mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 führte allerdings zu einer Abnahme des Paxillin-Proteingehalts bei 48 h, 96 h und 144 h. In der vorangegangenen Studie von Mohanty *et al.* (2023) wurde ebenfalls eine Abnahme des Paxillin-Proteingehalts in H23-, H358- und SW1573-Zellen mittels Immunoblotting nach 72-stündiger AMG510-Behandlung nachgewiesen, wobei jedoch mit 1,6 μ M bis 6,4 μ M AMG510 deutlich höhere Konzentrationen verwendet wurden (86) als in den eigenen Untersuchungen (20 nM AMG510). Somit könnte der Effekt des K-Ras G12C-Inhibitors auf Paxillin konzentrationsabhängig sein, was in weiterführenden Versuchen mittels Konzentrationsreihen analysiert werden sollte.

4.4 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulierbarkeit der Signaltransduktionsmoleküle ERK1/2, Akt und GSK3 α durch EGF in den K-Ras G12C-mutierten NSCLC-Zellen HCC-44 und H23 nachgewiesen. Die 2- und 24-stündige Präinkubation dieser Zellen mit dem K-Ras G12C-Inhibitor AMG510 führte zu einer Abnahme der EGF-induzierten Stimulation von Akt in H23- und HCC-44-Zellen sowie von ERK1/2 in H23-Zellen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass AMG510 nach zweistündiger Behandlung in Zellen beider Zelllinien zu einer Inhibition der basalen Aktivität von Akt und GSK3 α führt. In HCC-44-, H23- und MIA PaCa-2-Zellen führten die beiden K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 nach 16- bis 144-stündiger Behandlung zu einer Abnahme der ERK1/2-Aktivität. Zusammenfassend belegen die Daten der vorliegenden Arbeit eine Inhibition Ras-abhängiger Signaltransduktionsmoleküle durch MRTX849 und AMG510 in K-Ras G12C-mutierten Zelllinien.

Immunoblotanalysen der vorliegenden Arbeit ergaben zwar in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-Zellen eine tendenzielle Verminderung der Phosphorylierung von Vimentin an Ser38, jedoch keine signifikanten Auswirkungen der K-Ras G12C-Inhibitoren auf den Proteingehalt zentraler EMT-Marker wie Vimentin und E-Cadherin in MIA PaCa-2-, H23- oder HCC-44-Zellen. Allerdings konnten unter Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren deutliche Veränderungen des Zytoskeletts beobachtet werden. Die prägnanteste Veränderung des Vimentinfilament-Netzwerks wurden dabei in MIA PaCa-2-Zellen beobachtet. Die Inhibition von K-Ras G12C durch MRTX849 bzw. AMG510 führte in diesen Zellen zur Ausbildung von dicken, die Zellen durchziehenden Filament-Bündeln. In H23-Zellen konnte diese Reorganisation der Vimentinfilamente nach MRTX849- und AMG510-Behandlung in geringerer Ausprägung sowie eine vermehrte perinukleäre Vimentin-Anreicherung beobachtet werden. HCC-44-Zellen wiederum bildeten unter Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren ein diffus verteiltes Vimentinfilament-Netzwerk aus, in denen sich lange, faserartige Filamente aufzulösen schienen. Neben Auswirkungen auf das Intermediärfilament-Netzwerk, wurde auch die Ausbildung von Aktin-Stressfasern sowie die vermehrte Bildung Vinkulin-haltiger Fokalkontakte unter Einfluss der K-Ras G12C-Inhibitoren in allen untersuchten Zellen beobachtet. Die K-Ras G12C-Inhibition in MIA PaCa-2-Zellen führte darüber hinaus zur vermehrten Akkumulation von Paxillin und β -Catenin in Plaques im Bereich der Zellmembran. Einhergehend mit den Veränderungen des Zytoskeletts führten die K-Ras G12C-Inhibitoren zu einer rundlicheren Morphologie der untersuchten Zellen sowie zu einer Zunahme der Zellfläche. Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit lassen darauf schließen, dass die K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 zu einem Umbau des Zytoskeletts und damit einhergehend zu morphologischen Veränderungen führen. Die tendenzielle Zunahme des Vimentin-Proteingehalts in MIA PaCa-2-Zellen in Zusammenschau mit den Veränderungen vor allem des Vimentin- und Aktinzytoskeletts lassen darauf schließen, dass die K-Ras G12C-Inhibition durch MRTX849 und AMG510 zu einem mesenchymaleren Phänotyp der behandelten Zellen führt. Die Ausprägung der Veränderungen des Zytoskeletts scheinen sich allerdings zwischen den Zelllinien zu unterscheiden.

Ob die im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgeführten Veränderungen des Zytoskeletts in MRTX849- und AMG510-behandelten Zellen auch mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Invasivität der Zellen einhergehen, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Interessant wäre zudem, ob die Erhöhung der Inhibitorkonzentration oder eine über die in den eigenen Analysen verwendete 144-stündige Behandlungsdauer hinausgehende Inkubationszeit auch in den HCC-44-Zellen zu einer ähnlichen Reorganisation des Vimentinfilament-Netzwerks wie in den MIA PaCa-2-Zellen führen würde.

Neben MRTX849 und AMG510 wurden weitere K-Ras-Inhibitoren entwickelt. Darunter ist beispielweise D-1553, welches kovalent an inaktives GDP-K-Ras G12C bindet (112) oder der K-Ras G12D-Inhibitor MRTX1133 (39, 124), für den ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Expression von mesenchymalen Markerproteinen und der intrinsischen und erworbenen Resistenz aufgezeigt wurde (23). In weiteren Studien könnte der Frage nachgegangen werden, ob diese Inhibitoren ebenfalls das zelluläre Zytoskelett beeinflussen und ob damit auch Veränderungen der Migration und Invasivität der Zellen einhergeht.

5 Zusammenfassung

Onkogenes, mutiertes K-Ras kann zur Entwicklung eines invasiven, metastasierenden Phänotyps führen. Die Punktmutation G12C, die häufig in *non small cell lung cancer* (NSCLC)-Tumoren und zu einem geringen Teil in Adenokarzinomen des Pankreas vorkommt, führt zu einem konstitutiv aktiven Zustand dieses Onkogens. Die Entdeckung einer geeigneten Bindungsstelle an K-Ras G12C ermöglichte die Entwicklung direkter K-Ras G12C-Inhibitoren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der zwei irreversiblen K-Ras G12C-Inhibitoren MRTX849 und AMG510 auf zentrale Ras-abhängige Signaltransduktionsmoleküle und auf Markerproteine der epithelial-mesenchymalen Transition sowie auf das Zytoskelett und die Zellmorphologie in homo- bzw. heterozygot K-Ras G12C-mutierten NSCLC- und Pankreaskarzinomzellen untersucht.

Die K-Ras G12C-Inhibition durch MRTX849 und AMG510 führte je nach Zelllinie zu einer reduzierten Aktivität des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs und des PI3K-Akt-Signalwegs. Diese Signalwege waren trotz Vorliegen des konstitutiv aktiven K-Ras G12C durch den *epidermal growth factor* (EGF) und durch unspezifische Wachstumsfaktoren des Fötalen Kälber Serums stimulierbar. Die Präinkubation mit MRTX849 und AMG510 konnte den aktivierenden Effekt von EGF auf Signaltransduktionsmoleküle reduzieren.

Die MRTX849- und AMG510-Behandlung führte zur vermehrten Ausbildung Vinkulin- und Paxillin-haltiger fokalen Kontakte und Aktin-Stressfasern sowie in zwei der drei untersuchten Zelllinien zur Reorganisation des Vimentinzytoskeletts mit Bildung von dicken Filamentbündeln. Mit dem Umbau des Zytoskeletts gingen zellmorphologische Veränderungen und eine Vergrößerung der Zellfläche einher. Die Behandlung der Zellen mit MRTX849 und AMG510 führte nicht zu signifikanten Veränderungen des Vimentin-Proteingehalts, was eine Umverteilung dieses Zytoskelettproteins vermuten lässt. Hierauf könnte die tendenzielle Abnahme der Phosphorylierung von Vimentin an Serin38 unter Einfluss beider Inhibitoren sowie die Abnahme der Vimentin-Genexpression unter MRTX849-Behandlung in der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinie hindeuten.

Die beobachteten zytoskelettalen Veränderungen könnten einen Hinweis auf ein verändertes metastatisches Potenzial der Zellen unter MRTX849- oder AMG510-Behandlung geben.

6 Abstract

Oncogenic, mutated K-Ras can cause the development of an invasive and metastatic phenotype. The G12C point mutation, which occurs frequently in non small cell lung cancer (NSCLC) carcinomas and to a lesser extent in pancreatic adenocarcinomas, results in a constitutively activated K-Ras oncogene. The discovery of a binding pocket of K-Ras G12C led to the development of direct inhibitors. The present study investigated the effect of the irreversible K-Ras G12C inhibitors MRTX849 and AMG510 on Ras-dependent signaling molecules and epithelial-mesenchymal transition marker in homozygous or heterozygous K-Ras G12C mutated NSCLC cells and pancreatic cancer cells.

Inhibition of K-Ras G12C by MRTX849 and AMG510 led to a reduction in the activity of the Ras-Raf-MEK-ERK and the PI3K-Akt signaling pathways, dependent of the cell line. Despite the presence of the constitutively active K-Ras G12C, these signaling pathways were stimuable by epidermal growth factor (EGF) and nonspecific growth factors from fetal calf serum. Pre-incubation of cells with MRTX849 and AMG510 reduced the activating effect of EGF on signaling molecules.

Treatment with MRTX849 and AMG510 led to an increase in the formation und thus number of vinculin- and paxillin-containing focal contacts and actin stress fibres as well as reorganization of the vimentin cytoskeleton, with the formation of thick vimentin filament bundles observed in two of the three studied cell lines. Cytoskeletal remodeling was accompined by morphological changes and an increase in cell surface area. Treatment with MRTX849 and AMG510 did not lead to significant changes in vimentin protein levels, suggesting a redistribution. This redistribution could be indicated by a decreasing trend in the phosphorylation of vimentin at serine38 under the influence of both inhibitors and the decrease in vimentin-gene expression under MRTX849 treatment in the investigated pancreatic carcinoma cell line.

The observed cytoskeletal changes may indicate alterations in the metastatic potential of cells treated with MRTX849 or AMG510.

7 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CMF-PBS	Kalzium und Magnesium freie-Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	Fötales Kälber Serum
FTase	Farnesyltransferase
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HVR	hypervariable Region
ICMT	<i>isoprenylcysteine carboxymethyl-transferase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRH	Krebs-Ringer-Hepes-Puffer
LEF	<i>lymphoid enhancer binding factor</i>
m/V	Masse pro Volumen
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
Milli-Q	Reinstwasser
mk	monoklonal
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat
NaCl	Natriumchlorid

NaF	Natriumfluorid
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
p70 S6K	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>
pAkt	<i>phosphoryliertes Akt</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PDAC	duktales Adenokarzinom
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
pERK1/2	phosphoryliertes ERK1/2
PFA	Paraformaldehyd
pGSK3 α/β	<i>phosphorylierte GSK3α/β</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Proteaseinhibitor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat
pk	polyklonal
P-Loop	<i>phosphate-binding loop</i>
pS6	<i>phosphoryliertes S6</i>
pVimSer38	an Serin38 phosphoryliertes Vimentin
pVimSer83	an Serin83 phosphoryliertes Vimentin
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RCE1	<i>Ras converting enzyme-1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RPLP0	ribosomal protein lateral stalk subunit P0
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S6	ribosomales Protein S6
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHIP	<i>Src homology 2 containing phosphatases</i>
S-IIP	<i>switch-II-pocket</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
STI	<i>Trypsininhibitor from Soybean</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween® 20</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween® 20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WT	<i>wild type</i>

8 Literatur

1. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 12):3655–63. doi: 10.1242/jcs.107.12.3655.
2. Adachi Y, Ito K, Hayashi Y, Kimura R, Tan TZ, Yamaguchi R et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition is a Cause of Both Intrinsic and Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitor in KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2020; 26(22):5962–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2077.
3. Adachi Y, Kimura R, Hirade K, Yanase S, Nishioka Y, Kasuga N et al. Scribble mislocalization induces adaptive resistance to KRAS G12C inhibitors through feedback activation of MAPK signaling mediated by YAP-induced MRAS. *Nat Cancer* 2023; 4(6):829–43. doi: 10.1038/s43018-023-00575-2.
4. Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 13(1):39–51. doi: 10.1038/nrm3255.
5. Bai M, Xie J, Liu X, Chen X, Liu W, Wu F et al. Microenvironmental Stiffness Regulates Dental Papilla Cell Differentiation: Implications for the Importance of Fibronectin-Paxillin- β -Catenin Axis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018; 10(32):26917–27. doi: 10.1021/acsami.8b08450.
6. Basu A, Paul MK, Alioscha-Perez M, Grosberg A, Sahli H, Dubinett SM et al. Statistical parametrization of cell cytoskeleton reveals lung cancer cytoskeletal phenotype with partial EMT signature. *Commun Biol* 2022; 5(1):407. doi: 10.1038/s42003-022-03358-0.
7. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(3):268–75. doi: 10.4161/cbt.3.3.703.
8. Berr AL, Wiese K, Dos Santos G, Koch CM, Anekalla KR, Kidd M et al. Vimentin is required for tumor progression and metastasis in a mouse model of non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2023; 42(25):2074–87. doi: 10.1038/s41388-023-02703-9.
9. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 1998; 194(10):701–4. doi: 10.1016/s0344-0338(98)80129-5.
10. Brazel D, Kim J, Ou S-HI. CodeBreakK 200: Sotorasib (AMG510) Has Broken the KRAS G12C+ NSCLC Enigma Code. *Lung Cancer (Auckl)* 2023; 14:31–9. doi: 10.2147/LCTT.S403614.
11. Burrridge K, Guilluy C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res* 2016; 343(1):14–20. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.029.
12. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019; 575(7781):217–23. doi: 10.1038/s41586-019-1694-1.
13. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573):1655–7. doi: 10.1126/science.296.5573.1655.

14. Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD et al. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983; 304(5926):507–13. doi: 10.1038/304507a0.
15. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2011; 2(3):261–74. doi: 10.1177/1947601911408079.
16. Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2011; 2(3):216–31. doi: 10.1177/1947601911408081.
17. Chan C-H, Chiou L-W, Lee T-Y, Liu Y-R, Hsieh T-H, Yang C-Y et al. PAK and PI3K pathway activation confers resistance to KRASG12C inhibitor sotorasib. *Br J Cancer* 2023; 128(1):148–59. doi: 10.1038/s41416-022-02032-w.
18. Chin YR, Toker A. Akt2 regulates expression of the actin-bundling protein palladin. *FEBS Lett* 2010; 584(23):4769–74. doi: 10.1016/j.febslet.2010.10.056.
19. Chin YR, Toker A. The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol Cell* 2010; 38(3):333–44. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.031.
20. Cogli L, Progida C, Bramato R, Bucci C. Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(6):1283–93. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.024.
21. Datta A, Deng S, Gopal V, Yap KC-H, Halim CE, Lye ML et al. Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Cancers (Basel)* 2021; 13(8). doi: 10.3390/cancers13081882.
22. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2013; 81(1):117–22. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.011.
23. Dilly J, Hoffman MT, Abbassi L, Li Z, Paradiso F, Parent BD et al. Mechanisms of Resistance to Oncogenic KRAS Inhibition in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 2024:OF1-OF27. doi: 10.1158/2159-8290.CD-24-0177.
24. Dixon RDS, Arneman DK, Rachlin AS, Sundaresan NR, Costello MJ, Campbell SL et al. Palladin is an actin cross-linking protein that uses immunoglobulin-like domains to bind filamentous actin. *J Biol Chem* 2008; 283(10):6222–31. doi: 10.1074/jbc.M707694200.
25. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res* 2012; 18(22):6169–77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
26. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1):11–22. doi: 10.1038/nrc969.
27. Dreissigacker U, Mueller MS, Unger M, Siegert P, Genze F, Gierschik P et al. Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38. *Cell Signal* 2006; 18(8):1156–68. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.09.004.
28. Dubrovskiy O, Tian X, Poroyko V, Yakubov B, Birukova AA, Birukov KG. Identification of paxillin domains interacting with β -catenin. *FEBS Lett* 2012; 586(16):2294–9. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.016.

29. Fell JB, Fischer JP, Baer BR, Blake JF, Bouhana K, Briere DM et al. Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRASG12C Inhibitor for the Treatment of Cancer. *J Med Chem* 2020; 63(13):6679–93. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b02052.
30. Fensterer H, Giehl K, Buchholz M, Ellenrieder V, Buck A, Kestler HA et al. Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39(3):224–35. doi: 10.1002/gcc.20000.
31. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113(1):173–85. doi: 10.1083/jcb.113.1.173.
32. Geißert R, Lammert A, Wirth S, Hönig R, Lohfink D, Unger M et al. K-Ras(V12) differentially affects the three Akt isoforms in lung and pancreatic carcinoma cells and upregulates E-cadherin and NCAM via Akt3. *Cell Communication and Signaling* 2024; 22(1):85. doi: 10.1186/s12964-024-01484-2.
33. Giehl K, Skripczynski B, Mansard A, Menke A, Gierschik P. Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 2000; 19(25):2930–42. doi: 10.1038/sj.onc.1203612.
34. Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(10):2658–64.
35. Gotoh N. Somatic mutations of the EGF receptor and their signal transducers affect the efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(4):403–9.
36. Gradiz R, Silva HC, Carvalho L, Botelho MF, Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Sci Rep* 2016; 6:21648. doi: 10.1038/srep21648.
37. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(8):622–34. doi: 10.1038/nrm1699.
38. Gysin S, Salt M, Young A, McCormick F. Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer* 2011; 2(3):359–72. doi: 10.1177/1947601911412376.
39. Hallin J, Bowcut V, Calinisan A, Briere DM, Hargis L, Engstrom LD et al. Anti-tumor efficacy of a potent and selective non-covalent KRASG12D inhibitor. *Nat Med* 2022; 28(10):2171–82. doi: 10.1038/s41591-022-02007-7.
40. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM et al. The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov* 2020; 10(1):54–71. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1167.
41. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(5):373–84. doi: 10.1038/nrm1105.
42. Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 1990; 63(1):133–9. doi: 10.1016/0092-8674(90)90294-o.

43. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell* 2011; 22(24):4750–64. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0119.
44. Helfand BT, Mendez MG, Murthy SNP, Shumaker DK, Grin B, Mahammad S et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell* 2011; 22(8):1274–89. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0699.
45. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8(2):177–85. doi: 10.1016/s0959-440x(98)80035-3.
46. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI et al. KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med* 2020; 383(13):1207–17. doi: 10.1056/NEJMoa1917239.
47. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143(2):545–54.
48. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1):386. doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.
49. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, Gurbani D, Gondi S, Westover KD. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol Cancer Res* 2015; 13(9):1325–35. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203.
50. Hyder CL, Pallari H-M, Kochin V, Eriksson JE. Providing cellular signposts-post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett* 2008; 582(14):2140–8. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.064.
51. Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 2002; 159(3):465–76. doi: 10.1083/jcb.200205115.
52. Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10(4). doi: 10.1101/cshperspect.a018275.
53. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou S-HI, Pacheco JM et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *N Engl J Med* 2022; 387(2):120–31. doi: 10.1056/NEJMoa2204619.
54. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in molecular neuroscience* 2011; 4:40. doi: 10.3389/fnmol.2011.00040.
55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420–8. doi: 10.1172/JCI39104.
56. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong S-M, Yu J, Borges M et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2012; 142(4):730-733.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.042.

57. Keirsebilck A, Bonn  S, Staes K, van Hengel J, Nollet F, Reynolds A et al. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 1998; 50(2):129–46. doi: 10.1006/geno.1998.5325.
58. Kim R-K, Suh Y, Yoo K-C, Cui Y-H, Kim H, Kim M-J et al. Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. *Exp Mol Med* 2015; 47(1):e137. doi: 10.1038/emm.2014.99.
59. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* 1995; 130(1):67–77. doi: 10.1083/jcb.130.1.67.
60. K lsch A, Windoffer R, Leube RE. Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66(11):976–85. doi: 10.1002/cm.20395.
61. K lsch A, Windoffer R, W rflinger T, Aach T, Leube RE. The keratin-filament cycle of assembly and disassembly. *J Cell Sci* 2010; 123(13):2266–72. doi: 10.1242/jcs.068080.
62. Krygowska AA, Castellano E. PI3K: A Crucial Piece in the RAS Signaling Puzzle. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8(6). doi: 10.1101/cshperspect.a031450.
63. Kuburich NA, Hollander P den, Pietz JT, Mani SA. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Semin Cancer Biol* 2022; 86(Pt 3):816–26. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.12.006.
64. La Corral de Fuente E, Olmedo Garcia ME, Gomez Rueda A, Lage Y, Garrido P. Targeting KRAS in Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in oncology* 2022; 11:792635. doi: 10.3389/fonc.2021.792635.
65. Lai YK, Lee WC, Chen KD. Vimentin serves as a phosphate sink during the apparent activation of protein kinases by okadaic acid in mammalian cells. *J Cell Biochem* 1993; 53(2):161–8. doi: 10.1002/jcb.240530209.
66. Lammert A. Charakterisierung der molekularen Mechanismen der K-Ras/Akt-regulierten Motilit t sowie der Funktion von Akt-Effektoren in Karzinomzelllinien mit onkogenem K-Ras. Gießen: Universit tsbibliothek Gießen; 2018.
67. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007; 178(3):437–51. doi: 10.1083/jcb.200611146.
68. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3):178–96. doi: 10.1038/nrm3758.
69. Lanman BA, Allen JR, Allen JG, Amegadzie AK, Ashton KS, Booker SK et al. Discovery of a Covalent Inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *J Med Chem* 2020; 63(1):52–65. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01180.
70. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(10):607–32. doi: 10.1038/s41580-020-0255-7.
71. Lee JK, Sivakumar S, Schrock AB, Madison R, Fabrizio D, Gjoerup O et al. Comprehensive pan-cancer genomic landscape of KRAS altered cancers and real-world outcomes in solid tumors. *NPJ Precis Oncol* 2022; 6(1):91. doi: 10.1038/s41698-022-00334-z.

72. Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J, Rivard N. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene* 2015; 34(38):4914–27. doi: 10.1038/onc.2014.416.
73. Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I et al. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 1997; 16(2):281–94. doi: 10.1093/emboj/16.2.281.
74. LI-COR Biosciences. Odyssey CLx Operator's Manual: LI-COR Biosciences; 2019 [Stand: 17.07.2025]. Verfügbar unter: <https://licor.app.box.com/s/8prh6ps2abjbemx68412>.
75. Lim TKH, Skoulidis F, Kerr KM, Ahn M-J, Kapp JR, Soares FA et al. KRAS G12C in advanced NSCLC: Prevalence, co-mutations, and testing. *Lung Cancer* 2023; 184:107293. doi: 10.1016/j.lungcan.2023.107293.
76. Llorente-González C, González-Rodríguez M, Vicente-Manzanares M. Targeting cytoskeletal phosphorylation in cancer. *Explor Target Antitumor Ther* 2021; 2(3):292–308. doi: 10.37349/etat.2021.00047.
77. Lowery J, Kuczmarski ER, Herrmann H, Goldman RD. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *J Biol Chem* 2015; 290(28):17145–53. doi: 10.1074/jbc.R115.640359.
78. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:851–91. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.004223.
79. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 5):873–87. doi: 10.1242/jcs.01634.
80. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017; 169(3):381–405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
81. Mazloom-Farsibaf H, Farzam F, Fazel M, Wester MJ, Meddens MBM, Lidke KA. Comparing lifeact and phalloidin for super-resolution imaging of actin in fixed cells. *PLoS One* 2021; 16(1):e0246138. doi: 10.1371/journal.pone.0246138.
82. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983; 304(5926):501–6. doi: 10.1038/304501a0.
83. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 2010; 24(6):1838–51. doi: 10.1096/fj.09-151639.
84. Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S et al. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247(4945):939–45. doi: 10.1126/science.2406906.
85. Misale S, Fatherree JP, Cortez E, Li C, Bilton S, Timonina D et al. KRAS G12C NSCLC Models Are Sensitive to Direct Targeting of KRAS in Combination with PI3K Inhibition. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019; 25(2):796–807. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0368.
86. Mohanty A, Nam A, Srivastava S, Jones J, Lomenick B, Singhal SS et al. Acquired resistance to KRAS G12C small-molecule inhibitors via genetic/nongenetic

- mechanisms in lung cancer. *Sci Adv* 2023; 9(41):eade3816. doi: 10.1126/sciadv.ade3816.
87. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(6):705–33. doi: 10.1007/s00418-008-0435-6.
 88. Moon RT, Kohn AD, Ferrari GV de, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; 5(9):691–701. doi: 10.1038/nrg1427.
 89. Nagasaka M, Li Y, Sukari A, Ou S-HI, Al-Hallak MN, Azmi AS. KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne? *Cancer Treat Rev* 2020; 84:101974. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101974.
 90. Nurmagambetova A, Mustyatsa V, Saidova A, Vorobjev I. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT. *Sci Rep* 2023; 13(1):22164. doi: 10.1038/s41598-023-48279-y.
 91. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013; 503(7477):548–51. doi: 10.1038/nature12796.
 92. Otsuru T, Kobayashi S, Wada H, Takahashi T, Gotoh K, Iwagami Y et al. Epithelial-mesenchymal transition via transforming growth factor beta in pancreatic cancer is potentiated by the inflammatory glycoprotein leucine-rich alpha-2 glycoprotein. *Cancer Sci* 2019; 110(3):985–96. doi: 10.1111/cas.13918.
 93. Ou S-HI, Jänne PA, Leal TA, Rybkin II, Sabari JK, Barve MA et al. First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients with Advanced KRASG12C Solid Tumors (KRYSTAL-1). *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2022; 40(23):2530–8. doi: 10.1200/JCO.21.02752.
 94. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(11):4246–50. doi: 10.1073/pnas.87.11.4246.
 95. Petit V, Thiery JP. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 2000; 92(7):477–94. doi: 10.1016/s0248-4900(00)01101-1.
 96. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(4):1244–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1911.
 97. Prior IA, Hancock JF. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(2):145–53. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.09.002.
 98. PubChem. Adagrasib; 2024 [Stand: 07.08.2024]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/138611145>.
 99. Qi W, Li H, Wang Y, Xu L, Deng J, Zhang X et al. Targeting PI3K α overcomes resistance to KRasG12C inhibitors mediated by activation of EGFR and/or IGF1R. *Acta Pharmacol Sin* 2023; 44(5):1083–94. doi: 10.1038/s41401-022-01015-0.
 100. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 2013; 3(3):71–85.

101. Rathinaswamy MK, Burke JE. Class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulatory subunits and their roles in signaling and disease. *Adv Biol Regul* 2020; 75:100657. doi: 10.1016/j.jbior.2019.100657.
102. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
103. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Hrsg. *Krebs in Deutschland für 2019/2020; 2023*.
104. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; 370(6490):527–32. doi: 10.1038/370527a0.
105. Rosell R, Codony-Servat J, González J, Santarpia M, Jain A, Shivamallu C et al. KRAS G12C-mutant driven non-small cell lung cancer (NSCLC). *Crit Rev Oncol Hematol* 2024; 195:104228. doi: 10.1016/j.critrevonc.2023.104228.
106. Ryan MB, La Fece de Cruz F, Phat S, Myers DT, Wong E, Shahzade HA et al. Vertical Pathway Inhibition Overcomes Adaptive Feedback Resistance to KRASG12C Inhibition. *Clin Cancer Res* 2020; 26(7):1633–43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3523.
107. Saito R-A, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T et al. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69(7):2783–91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3490.
108. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019; 28(10):1563–79. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
109. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277(5324):333–8. doi: 10.1126/science.277.5324.333.
110. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7):676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
111. Seiz JR. *Rac1b-spezifische Effekte und Auswirkungen der 3D-Kultivierung auf Differenzierung und Signaltransduktion in NSCLC-Zelllinien*. Gießen: Universitätsbibliothek Gießen; 2019.
112. Shi Z, Weng J, Niu H, Yang H, Liu R, Weng Y et al. D-1553: A novel KRAS G12C inhibitor with potent and selective cellular and in vivo antitumor activity. *Cancer Sci* 2023; 114(7):2951–60. doi: 10.1111/cas.15829.
113. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 2017; 170(1):17–33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009.
114. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* 2021; 384(25):2371–81. doi: 10.1056/NEJMoa2103695.
115. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3):163–77. doi: 10.1038/nrm3753.

116. Springfield C, Krug S, Neoptolemos J, Jäger D. Aktuelle systemische Therapie beim Pankreaskarzinom. *Onkologie* 2023; 29(9):769–77. doi: 10.1007/s00761-023-01382-1.
117. Sun L, Xing J, Zhou X, Song X, Gao S. Wnt/ β -catenin signalling, epithelial-mesenchymal transition and crosslink signalling in colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2024; 175:116685. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116685.
118. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 2000; 148(1):189–202. doi: 10.1083/jcb.148.1.189.
119. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR et al. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:567305. doi: 10.1155/2011/567305.
120. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 8):1855–64. doi: 10.1242/jcs.098087.
121. Tsai FD, Lopes MS, Zhou M, Court H, Ponce O, Fiordalisi JJ et al. K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(3):779–84. doi: 10.1073/pnas.1412811112.
122. Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh M-T et al. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel)* 2021; 13(19). doi: 10.3390/cancers13194985.
123. Veluswamy R, Mack PC, Houldsworth J, Elkhoully E, Hirsch FR. KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Developmental Therapeutics, and Molecular Testing. *J Mol Diagn* 2021; 23(5):507–20. doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.02.002.
124. Wang X, Allen S, Blake JF, Bowcut V, Briere DM, Calinisan A et al. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *J Med Chem* 2022; 65(4):3123–33. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01688.
125. Waters AM, Ozkan-Dagliyan I, Vaseva AV, Fer N, Strathern LA, Hobbs GA et al. Evaluation of the selectivity and sensitivity of isoform- and mutation-specific RAS antibodies. *Sci Signal* 2017; 10(498). doi: 10.1126/scisignal.aao3332.
126. Wegner A. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 1976; 108(1):139–50. doi: 10.1016/s0022-2836(76)80100-3.
127. Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011; 194(5):669–78. doi: 10.1083/jcb.201008095.
128. Windoffer R, Wöll S, Strnad P, Leube RE. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15(5):2436–48. doi: 10.1091/mbc.e03-09-0707.
129. Wittinghofer A, Pai EF. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 1991; 16(10):382–7. doi: 10.1016/0968-0004(91)90156-p.
130. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* 2022; 163(2):386-402.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.

131. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; 14(6):818–29. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.
132. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 1998; 141(3):779–89. doi: 10.1083/jcb.141.3.779.
133. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2):15–33. doi: 10.1007/s10555-008-9169-0.
134. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(3):288–300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.
135. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1429–37. doi: 10.1172/JCI36183.
136. Zhang J-Y, Wang Y-T, Sun L, Wang S-Q, Chen Z-S. Synthesis and clinical application of new drugs approved by FDA in 2022. *Mol Biomed* 2023; 4(1):26. doi: 10.1186/s43556-023-00138-y.
137. Zhang Q, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, Chen S et al. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterol Res Pract* 2016; 2016:8962321. doi: 10.1155/2016/8962321.
138. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; 12(1):9–18. doi: 10.1038/sj.cr.7290105.
139. Zhang Y, Liu L, Pei J, Ren Z, Deng Y, Yu K. Tissue factor overexpression promotes resistance to KRAS-G12C inhibition in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2024; 43(9):668–81. doi: 10.1038/s41388-023-02924-y.
140. Zhu Q-S, Rosenblatt K, Huang K-L, Lahat G, Brobey R, Bolshakov S et al. Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene* 2011; 30(4):457–70. doi: 10.1038/onc.2010.421.

9 Anhang

9.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle 16: Einfluss der MRTX849- bzw. AMG510-Präinkubation auf die Aktivierbarkeit von ERK1/2, Akt und S6 durch EGF in HCC-44- und H23-Zellen. Zellen dieser Zelllinien wurden für 24 h in serumfreiem Medium mit MRTX849 bzw. AMG510 behandelt und 15 min vor der Zellyse in serumfreiem Medium mit 30 ng/mL EGF stimuliert. Der Nachweis von ERK1/2, Akt, GSK3 α/β und S6 erfolgte im Immunoblotverfahren. Die Signalintensität der Banden wurde densitometrisch ausgemessen. Zur Bestimmung der relativen Phosphorylierung wurde die Intensität des phosphorylierten Proteins ins Verhältnis zur Signalintensität der Protein-Gesamtmenge gesetzt. Anschließend wurde die relative Phosphorylierung der EGF-stimulierten Probe ins Verhältnis zur unstimulierten Probe, welche mit DMSO bzw. der gleichen Inhibitor-Konzentration behandelt wurde, gesetzt und so die relative EGF-Stimulation bestimmt. Zur Analyse des Einflusses der MRTX849- bzw. AMG510-Präinkubation auf die Aktivierbarkeit der Signaltransduktionsmoleküle wurde nun das Verhältnis der relativen EGF-Stimulation der Inhibitor-behandelten Probe zur relativen EGF-Stimulation der DMSO-Probe gebildet. Die relative EGF-Stimulation der DMSO-Proben diente somit als Referenzwert und wurde auf 1 gesetzt. Rel.= Relativ.

HCC-44				
	MRTX849		AMG510	
	Rel. EGF-Stimulation	Rel. EGF-Stimulation (DMSO-normiert)	Rel. EGF-Stimulation	Rel. EGF-Stimulation (DMSO-normiert)
	pERK1/2		pERK1/2	
DMSO	2,28	1	2,05	1
1 nM	2,23	0,98	3,49	1,70
5 nM	-	-	3,42	1,67
10 nM	3,01	1,32	2,80	1,34
25 nM	-	-	3,44	1,68
50 nM	8,38	3,68	4,94	2,41
	pAkt		pAkt	
DMSO	1,62	1	4,05	1
1 nM	2,63	1,63	453	1,12
5 nM	-	-	4,03	0,99
10 nM	3,64	2,25	1,73	0,43
25 nM	-	-	3,69	0,91
50 nM	4,35	2,68	5,07	1,25
	pS6		pS6	
DMSO	2,99	1	1,87	1
1 nM	3,05	1,02	4,24	2,27
5 nM	-	-	6,28	3,36
10 nM	2,53	0,84	3,27	1,75
25 nM	-	-	2,57	1,38
50 nM	6,14	2,05	2,54	1,36
H23				
	MRTX849		AMG510	
	Rel. EGF-Stimulation	Rel. EGF-Stimulation (DMSO-normiert)	Rel. EGF-Stimulation	Rel. EGF-Stimulation (DMSO-normiert)
	pERK1/2		pERK1/2	
DMSO	1,36	1	1,38	1
1 nM	1,45	1,07	2,22	1,61

5 nM	1,29	0,95	0,47	0,34
10 nM	2,15	1,58	2,77	2,00
25 nM	2,23	1,64	4,30	3,11
	pS6		pS6	
DMSO	1,28	1	0,86	1
1 nM	1,54	1,20	1,14	1,32
5 nM	1,76	1,38	1,08	1,25
10 nM	1,52	1,18	0,86	1,00
25 nM	0,73	0,57	1,08	1,26

Tabelle 17: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Proteinexpression von Vimentin, pVimSer38, pVimSer83, Paxillin, Keratin, p120Catenin und β -Catenin, sowie die Phosphorylierung von ERK1/2 in MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 16 h, 48 h, 96 h und 144 h mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 oder zur Kontrolle mit DMSO in Kulturmedium behandelt. Alle 24 h erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, bei dem DMSO, 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 zu den Zellen gegeben wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 x RIPA-Lysepuffer. 50 μ g Proteinlysate wurde in einem 8,5-, 10 %- bzw. 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Immunoblotverfahren wurden die Proteine mittels Protein- bzw. phospho-Protein-spezifischer Antikörper am Odyssey CLx-System detektiert und die Signalintensität der Banden densitometrisch ermittelt. Für die Ermittlung der relativen Signalintensität wurde phosphoryliertes Vimentin auf die Vimentin-Gesamtmenge bezogen bzw. alle anderen Proteine auf die GAPDH-Beladungskontrolle normiert. Als Referenzwert, welcher auf 1 gesetzt wurde, diente die relative Signalintensität der DMSO-Kontrolle. Angegeben sind die Einzelwerte und der Mittelwert \pm SD der densitometrischen Auswertung. n.a. = nicht auswertbar; MW = Mittelwert.

MIA PaCa-2							
Vimentin							
16 h							MW \pm SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,97	0,97					0,97 \pm 0,00
20 nM AMG510	0,69	0,47					0,58 \pm 0,16
48 h							
DMSO	1	1	1	1	1	1	
20 nM MRTX849	0,80	1,06	1,26	0,78	0,98	1,41	1,05 \pm 0,25
20 nM AMG510	0,94	0,80	0,75	0,76	1,05	0,85	0,86 \pm 0,12
96 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,86	2,36	0,81				1,34 \pm 0,88
20 nM AMG510	0,97	2,01	0,83				1,27 \pm 0,65
144 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	1,25	1,90	1,21				1,45 \pm 0,39
20 nM AMG510	1,05	1,19	1,43				1,22 \pm 0,19
pVimSer38							
16 h							MW \pm SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,78	0,77					0,78 \pm 0,00
20 nM AMG510	0,47	0,65					0,56 \pm 0,12

48 h							
DMSO	1	1	1	1	1	1	
20 nM MRTX849	0,60	0,76	0,84	1,05	0,86	0,65	0,79 ± 0,16
20 nM AMG510	0,79	0,49	0,66	0,80	0,77	0,76	0,71 ± 0,12
96 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,73	0,58	0,93				0,75 ± 0,18
20 nM AMG510	0,72	0,67	0,94				0,77 ± 0,15
144 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,34	0,62	0,86				0,61 ± 0,26
20 nM AMG510	0,66	0,78	0,76				0,73 ± 0,06
pVimSer83							
16 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	1,38	1,05					1,21 ± 0,24
20 nM AMG510	n.a.	n.a.					n.a.
48 h							
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	1,77	1,93					1,61 ± 0,43
20 nM AMG510	0,36	0,81					0,69 ± 0,29
pERK1/2							
16 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,14	0,14					0,14 ± 0,00
20 nM AMG510	0,09	0,15					0,11 ± 0,04
48 h							
DMSO	1	1	1	1	1	1	
20 nM MRTX849	0,46	0,46	0,69	0,78	0,39	0,54	0,55 ± 0,15
20 nM AMG510	0,66	0,65	0,63	0,44	0,56	0,47	0,57 ± 0,09
96 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,35	0,52	0,56				0,48 ± 0,11
20 nM AMG510	0,71	0,84	0,45				0,67 ± 0,20
144 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,96	0,61	0,79				0,79 ± 0,18
20 nM AMG510	0,84	0,53	0,99				0,79 ± 0,24
Paxillin							
48 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,36	0,63					0,50 ± 0,19
20 nM AMG510	0,71	0,58					0,64 ± 0,09
96 h							
DMSO	1						
20 nM MRTX849	0,65						
20 nM AMG510	0,71						
144 h							
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,23	0,78					0,51 ± 0,39

20 nM AMG510	0,54	0,54					0,54 ± 0,00
Keratin							
48 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,60	1,00					0,80 ± 0,28
20 nM AMG510	0,52	0,91					0,72 ± 0,27
96 h							
DMSO	1						
20 nM MRTX849	1,17						
20 nM AMG510	1,53						
144 h							
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,40	0,65					0,52 ± 0,18
20 nM AMG510	0,60	0,49					0,55 ± 0,08
p120Catenin (n=1)				β-Catenin (n=1)			
48 h				48 h			
DMSO	1			DMSO	1		
20 nM MRTX849	0,47			20 nM MRTX849	0,41		
20 nM AMG510	0,82			20 nM AMG510	0,45		
96 h				96 h			
DMSO	1			DMSO	1		
20 nM MRTX849	0,58			20 nM MRTX849	0,50		
20 nM AMG510	0,85			20 nM AMG510	0,54		
144 h				144 h			
DMSO	1			DMSO	1		
20 nM MRTX849	0,75			20 nM MRTX849	0,80		
20 nM AMG510	1,03			20 nM AMG510	2,32		

Tabelle 18: Einfluss von MRTX849 und AMG510 auf die Proteinexpression von Vimentin, pVimSer38, p120Catenin, β-Catenin und E-Cadherin sowie die Phosphorylierung von ERK1/2 in HCC-44- und H23-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h, 96 h und 144 h mit 10 nM bzw. 20 nM MRTX849 und 20 nM AMG510 in Kulturmedium inkubiert. Beim Wechsel des Kulturmediums alle 24 h erfolgte entweder abwechselnd die Zugabe von 10 nM MRTX849 bzw. 20 nM AMG510 und 1/10 dieser Konzentration (*) oder die ursprüngliche Konzentration der Inhibitoren, wobei entweder 10 nM MRTX849 (**) oder 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 verwendet wurden. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 x RIPA-Lysepuffer. 50 µg Proteinlysate wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Immunoblotverfahren wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper am Odyssey CLx-System detektiert und die Signalintensität der Banden densitometrisch ermittelt. Für die Ermittlung der relativen Signalintensität wurde phosphoryliertes Vimentin auf die Vimentin-Gesamtmenge bezogen bzw. alle anderen Proteine auf die GAPDH-Beladungskontrolle normiert. Als Referenzwert, welcher auf 1 gesetzt wurde, diente die relative Signalintensität der DMSO-Kontrolle. Angegeben sind Einzelwerte der densitometrischen Analyse und der Mittelwert (MW) ± SD.

HCC-44						
Vimentin						
48 h						MW ± SD
DMSO	1	1	1	1	1	
20 nM MRTX849	0,90	1,06	0,67	1,15	1,01	0,96 ± 0,18
20 nM AMG510	0,74	0,88	0,65	0,73	1,02	0,80 ± 0,15

96 h							
DMSO	1	1	1				
MRTX849	1,06*	1,71	2,30				1,69 ± 0,62
20 nM AMG510	1,19*	2,60	2,23				2,00 ± 0,73
144 h							
DMSO	1	1	1	1			
MRTX849	0,77*	1,21**	1,09**	1,30			1,09 ± 0,23
20 nM AMG510	1,01*	0,54	1,45	1,31			1,08 ± 0,40
pVimentinSerin38							
48 h							MW ± SD
DMSO	1	1	1	1	1		
20 nM MRTX849	0,71	0,86	0,57	0,86	0,84		0,77 ± 0,13
20 nM AMG510	0,45	0,81	0,89	0,70	0,83		0,74 ± 0,17
96 h							
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,71	1,11					0,91 ± 0,29
20 nM AMG510	0,61	1,12					0,86 ± 0,25
144 h							
DMSO	1	1					
MRTX849	1,30**	1,32					1,31 ± 0,01
20 nM AMG510	2,11	1,33					1,72 ± 0,55
p120Catenin							
48 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	0,89	1,37					1,13 ± 0,34
20 nM AMG510	0,99	1,70					1,34 ± 0,50
96 h							
DMSO	1	1	1				
MRTX849	0,49*	0,64	1,07				0,74 ± 0,30
20 nM AMG510	0,93*	1,03	0,86				0,94 ± 0,09
144 h							
DMSO	1	1	1				
MRTX849	0,79*	0,35**	1,21				0,78 ± 0,42
20 nM AMG510	2,17*	0,52	1,44				1,38 ± 0,82
β-Catenin							
48 h							MW ± SD
DMSO	1	1					
20 nM MRTX849	1,13	1,73					1,43 ± 0,43
20 nM AMG510	1,17	1,89					1,53 ± 0,51
96 h							
DMSO	1	1	1				
MRTX849	1,07*	0,84	1,33				1,08 ± 0,24
20 nM AMG510	1,71*	1,00	1,04				1,25 ± 0,40
144 h							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,58*	0,44**	1,22				0,74 ± 0,42
20 nM AMG510	1,61*	0,72	1,40				1,24 ± 0,47
E-Cadherin							
48 h							MW ± SD
DMSO	1						

20 nM MRTX849	1,12					
20 nM AMG510	0,99					
96 h						
DMSO	1	1	1			
MRTX849	1,45*	1,21	1,46			1,37 ± 0,14
20 nM AMG510	1,56*	1,51	1,11			1,39 ± 0,24
144 h						
DMSO	1	1	1	1		
MRTX849	0,85*	1,44**	1,20**	1,29		1,19 ± 0,25
20 nM AMG510	1,52*	1,77	1,42	1,36		1,52 ± 0,18
pERK1/2						
48 h						MW ± SD
DMSO	1	1	1	1	1	
20 nM MRTX849	0,78	0,54	0,92	0,88	0,62	0,75 ± 0,16
20 nM AMG510	0,97	0,44	0,94	1,13	0,59	0,81 ± 0,29
96 h						
DMSO	1	1	1			
MRTX849	0,28*	0,45	0,67			0,47 ± 0,19
20 nM AMG510	0,38*	0,57	0,87			0,61 ± 0,25
144 h						
DMSO	1	1	1	1		
MRTX849	0,68*	0,95**	0,62**	0,71		0,76 ± 0,17
20 nM AMG510	0,51*	0,40	0,71	0,73		0,61 ± 0,18
H23						
Vimentin						
48 h						MW ± SD
DMSO	1					
20 nM MRTX849	0,92					
20 nM AMG510	0,70					
96 h						
DMSO	1	1				
MRTX849	0,52*	1,13				0,83 ± 0,43
20 nM AMG510	1,69*	1,92				1,81 ± 0,16
144 h						
DMSO	1	1	1			
10 nM MRTX849	1,06*	1,17**	1,69**			1,31 ± 0,34
20 nM AMG510	0,25*	0,52	1,74			0,83 ± 0,79
p120Catenin						
96 h						MW ± SD
DMSO	1	1				
MRTX849	1,24*	1,27				1,25 ± 0,02
20 nM AMG510	1,28*	0,89				1,08 ± 0,27
144 h						
DMSO	1	1				
10 nM MRTX849	1,30*	0,37**				0,83 ± 0,66
20 nM AMG510	1,60*	1,18				1,39 ± 0,30
β-Catenin						
96 h						MW ± SD
DMSO	1	1				

MRTX849	1,43*	1,21				1,32 ± 0,16
20 nM AMG510	1,39*	0,91				1,15 ± 0,34
144 h						
DMSO	1	1				
10 nM MRTX849	1,31*	0,72**				1,01 ± 0,42
20 nM AMG510	1,45*	1,57				1,51 ± 0,09
E-Cadherin						
96 h						MW ± SD
DMSO						
MRTX849	1,76*	1,05				1,40 ± 0,50
20 nM AMG510	2,43*	1,02				1,72 ± 1,0
144 h						
DMSO						
10 nM MRTX849	1,13*	1,54**	0,64**			1,10 ± 0,45
20 nM AMG510	1,20*	1,69	0,86			1,25 ± 0,42
pERK1/2						
48 h						MW ± SD
DMSO	1					
20 nM MRTX849	0,47					
20 nM AMG510	0,41					
96 h						
DMSO	1	1				
MRTX849	0,47*	0,50				0,48 ± 0,03
20 nM AMG510	0,76*	0,72				0,74 ± 0,03
144 h						
DMSO						
10 nM MRTX849	0,60*	0,71**	0,79**			0,70 ± 0,10
20 nM AMG510	0,74*	0,43	0,74			0,63 ± 0,18

Tabelle 19: Untersuchung der Verteilung von Vimentin und pVimSer38 in MRTX849- und AMG510-behandelten MIA PaCa-2-, HCC-44- und H23-Zellen mittels Tritonfraktionierung. Die Zellen wurden dafür in Kulturmedium mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 für 48 h behandelt mit einem Wechsel des Kulturmediums inklusive Zugabe des Inhibitors nach 24 h. Nach der Lyse der Zellen in Tritonpuffer folgte mittels Zentrifugation die Verteilung der Proteine in die tritonlösliche und tritonunlösliche Fraktion. Die 50 µg Proteinlysate wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel im Immunoblotverfahren mit spezifischen Antikörpern am Odyssey CLx-System detektiert und die Proteinmenge densitometrisch ermittelt. Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung bzw. Proteinmenge wurde das Verhältnis aus pVimSer38/Vimentin gebildet bzw. die anderen Proteine auf die GAPDH-Beladungskontrolle normiert und anschließend auf die DMSO-Kontrolle bezogen. Angegeben sind die Einzelwerte und der Mittelwert (MW) ± SD.

MIA PaCa-2						
Vimentin						
Tritonlösliche Fraktion						MW ± SD
DMSO	1	1	1			
20 nM MRTX849	1,06	0,32	0,94			0,78 ± 0,40
20 nM AMG510	0,90	0,78	1,08			0,92 ± 0,15
Tritonunlösliche Fraktion						
DMSO	1	1	1			

20 nM MRTX849	0,84	0,97	1,00				0,93 ± 0,09
20 nM AMG510	1,50	1,24	1,82				1,52 ± 0,29
pVimentinSer38							
Tritonlösliche Fraktion							MW ± SD
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,58	1,24	0,62				0,81 ± 0,37
20 nM AMG510	0,62	0,58	0,58				0,59 ± 0,02
Tritonunlösliche Fraktion							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,53	0,76	0,71				0,67 ± 0,12
20 nM AMG510	0,41	0,55	0,49				0,48 ± 0,07
pERK1/2							
Tritonlösliche Fraktion							MW ± SD
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,48	0,44	0,55				0,49 ± 0,05
20 nM AMG510	0,54	0,48	0,54				0,52 ± 0,03
Tritonunlösliche Fraktion							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,33	0,43	0,25				0,34 ± 0,09
20 nM AMG510	0,38	0,44	0,21				0,34 ± 0,12
HCC-44							
Vimentin							
Tritonlösliche Fraktion							MW ± SD
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	1,13	1,01	1,19				1,11 ± 0,09
20 nM AMG510	0,83	1,56	1,30				1,22 ± 0,37
Tritonunlösliche Fraktion							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	1,79	1,23	1,35				1,46 ± 0,29
20 nM AMG510	2,27	1,42	1,18				1,62 ± 0,57
pVimentinSer38							
Tritonlösliche Fraktion							MW ± SD
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,66	n.a.	n.a.				
20 nM AMG510	0,71	n.a.	n.a.				
Tritonunlösliche Fraktion							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,60	1,05	0,75				0,80 ± 0,23
20 nM AMG510	0,49	0,97	0,71				0,73 ± 0,24
pERK1/2							
Tritonlösliche Fraktion							MW ± SD
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,50	0,84	0,68				0,67 ± 0,17
20 nM AMG510	0,44	0,60	0,79				0,61 ± 0,18
Tritonunlösliche Fraktion							
DMSO	1	1	1				
20 nM MRTX849	0,55	0,75	0,01				0,44 ± 0,38
20 nM AMG510	0,65	0,80	0,77				0,74 ± 0,08

p120Catenin (n=1)		β-Catenin (n=1)	
Tritonlösliche Fraktion		Tritonlösliche Fraktion	
DMSO	1	DMSO	1
20 nM MRTX849	0,80	20 nM MRTX849	1,05
20 nM AMG510	0,87	20 nM AMG510	1,01
Tritonunlösliche Fraktion		Tritonunlösliche Fraktion	
DMSO	1	DMSO	1
20 nM MRTX849	1,54	20 nM MRTX849	1,29
20 nM AMG510	1,91	20 nM AMG510	2,42

H23

Vimentin

Tritonlösliche Fraktion						MW ± SD
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,89	2,31				1,60 ± 1,01
20 nM AMG510	0,64	2,36				1,50 ± 1,22
Tritonunlösliche Fraktion						
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,59	1,40				0,99 ± 0,57
20 nM AMG510	1,20	5,00				3,10 ± 2,68

pVimentinSer38

Tritonlösliche Fraktion						MW ± SD
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,74	0,42				0,58 ± 0,23
20 nM AMG510	0,87	0,29				0,58 ± 0,41
Tritonunlösliche Fraktion						
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,96	0,92				0,94 ± 0,03
20 nM AMG510	0,76	0,66				0,71 ± 0,07

pERK1/2

Tritonlösliche Fraktion						MW ± SD
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,37	0,42				0,40 ± 0,05
20 nM AMG510	0,44	0,37				0,39 ± 0,03
Tritonunlösliche Fraktion						
DMSO	1	1				
20 nM MRTX849	0,33	0,42				0,38 ± 0,06
20 nM AMG510	0,20	0,71				0,46 ± 0,36

9.2 Ergänzende Abbildungen

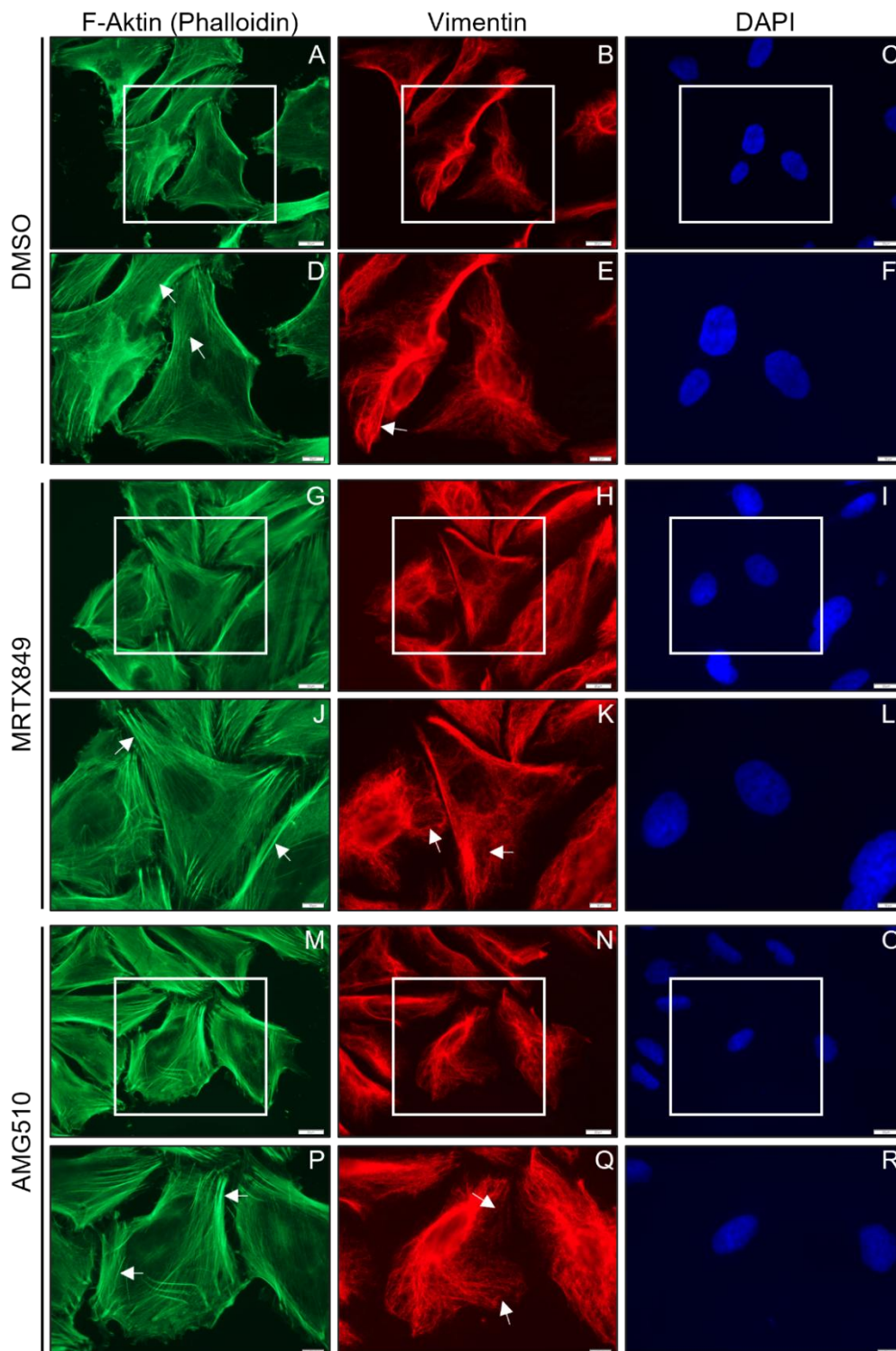


Abb. 39: MRTX849 und AMG510 beeinflussen das Aktin- und Vimentinzytoskelett in HCC-44-Zellen. HCC-44-Zellen wurden mit 10 nM MRTX849 (G-L) bzw. 20 nM AMG510 (M-R) für 96 h inkubiert, wobei alle 24 h abwechselnd die soeben beschriebenen Konzentrationen und 1/10 der genannten Inhibitorkonzentration zu den Zellen gegeben wurde. DMSO-inkubierte Zellen dienten als Kontrolle (A-F). Für den Nachweis von F-Aktin wurde Phalloidin gekoppelt an Alexa488 verwendet. Vimentin wurde ein mit einem Vimentin-Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Anfärbung des Kerns erfolgte mit DAPI. Abgebildet ist je eine ausgewählte Aufnahme aus 3-5 Aufnahmen (n=1), die in 60- und 100-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 aufgenommen wurden, wobei zur besseren Darstellung ein Ausschnitt aus der 60-fachen Vergrößerung (weißes Quadrat) in 100-facher Vergrößerung abgebildet ist. Maßstabbalken: 10 μm (D-F, J-L, P-R) bzw. 20 μm (A-C, G-I, M-O).

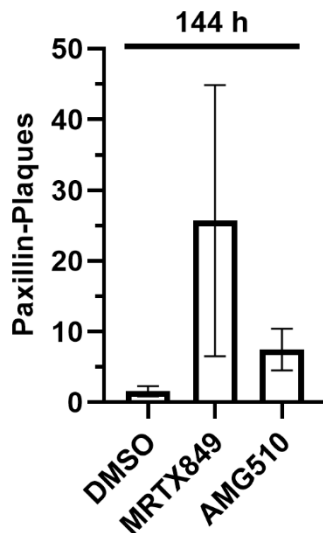


Abb. 40: MRTX849 und AMG510 induzieren die Ausbildung Paxillin-haltiger Plaques in MIA PaCa-2-Zellen. MIA PaCa-2-Zellen wurden für 144 h mit 20 nM MRTX849 bzw. AMG510 in Kulturmedium inkubiert. Als Kontrollzellen dienten DMSO-behandelte Zellen. Der Paxillin-Nachweis erfolgte mittels Immunfluoreszenzverfahren mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Anzahl Paxillin-haltiger Plaques wurde mit der Software Fiji (NIH) anhand der am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 aufgenommenen Bilder ermittelt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SD der ermittelten Plaques pro Zelle. Folgende Anzahl an Zellen wurde ausgemessen: DMSO: 123; MRTX849: 51; AMG510: 93. Der Paxillin-Nachweis erfolgte einmalig im Immunfluoreszenzverfahren (n=1).

9.3 Makro zur Quantifizierung Vinkulin- und Paxillin-haltiger Fokalkontakte

Zur Vereinfachung des Ablaufes der Analyse der Vinkulin- und Paxillin-haltigen fokalen Kontakte der untersuchten Zellen wurde in der *Open Source*-Software Fiji (NIH) nach Auswahl des zu analysierenden Bildausschnittes, welcher ganz Zellen beinhaltet, folgendes Makro erstellt und verwendet:

```
roiManager("Add");
run("Subtract Background...", "rolling=50 sliding");
//run("Brightness/Contrast...");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
setMinAndMax(144, 9408);
setAutoThreshold("Default dark no-reset");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
roiManager("Select", 0);
run("Analyze Particles...", "size=15-400 show=[Count Masks] display clear summarize");
```

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 03.08.2025

Ort/ Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei

meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl für das Überlassen dieses interessanten und spannenden Themas und für die gute wissenschaftliche Betreuung während meiner Labortätigkeit und der Erstellung meiner Arbeit.

dem gesamten Laborteam für die angenehme Atmosphäre und die geduldige Beantwortung so mancher technischer Fragen. Hierbei gilt mein besonderer Dank Dirk Lohfink, Stefanie Wirth und Rabea Hönig.

meinen Kommilitoninnen und Mitdoktorandinnen Liz Nagel und Lea Henrich für den wissenschaftlichen Austausch während der Labortätigkeit und des Schreibprozesses.

meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.

Auch möchte ich mich bei meinem Freund und meinen Freunden für die anhaltende Unterstützung und die Motivation stets weiter am Fortgang dieser Promotion zu arbeiten, bedanken.